



**UNIVERSIDAD DE BURGOS**

**Departamento de Química**

**Área de Química Analítica**

***NEW TECHNIQUES AND  
DEVICES FOR UV-VIS  
ABSORPTION  
SPECTROELECTROCHEMISTRY***

Memoria presentada por

**Daniel Izquierdo Bote**

Para optar al título de Doctor por la Universidad de Burgos

Directores:

**Álvaro Colina Santamaría**

**M<sup>a</sup> Aránzazu Heras Vidaurre**





DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE BURGOS

**D. Álvaro Colina Santamaría, profesor titular del Área  
de Química Analítica de la Universidad de Burgos**

y

**Dña. M<sup>a</sup> Aránzazu Heras Vidaurre, profesora titular  
del Área de Química Analítica de la Universidad de Burgos**

Hacen constar:

Que la presente memoria resume el trabajo titulado **“NEW TECHNIQUES AND DEVICES FOR UV-VIS SPECTROELECTROCHEMISTRY”** realizado por D. Daniel Izquierdo Bote 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, 15 de septiembre de 2015.

Fdo: Álvaro Colina Santamaría

Fdo: M<sup>a</sup> Aránzazu Heras Vidaurre



*A mis padres*



## AGRADECIMIENTOS

*Esta tesis puede verse como un resumen de mis investigaciones en estos últimos años. Sin embargo, no muestra más que una parte de lo vivido durante esta etapa, y este es el momento de dar las gracias a toda la gente que ha estado junto a mí durante todo este tiempo y que ha ayudado de una manera u otra a que esta tesis doctoral sea una realidad, porque sin su ayuda nunca podría haber tenido lugar.*

*Me gustaría agradecer al Prof. Jesús López Palacios, pozo de sabiduría y humildad, y a mis directores de tesis, el Dr. Álvaro Colina y la Dra. M<sup>a</sup> Aránzazu Heras, por su inestimable ayuda y por la confianza puesta en mí durante este tiempo. Pero especialmente, por todo lo que me han enseñado y por las experiencias vividas, tanto dentro del laboratorio entre potencióstatos y espectrofotómetros, como fuera de él, entre cañas y risas. Gracias por todo, especialmente por ayudarme a madurar y crecer tanto nivel científico como a nivel personal. No podría haber deseado mejores jefes/compañeros que ellos para compartir estos años.*

*También quiero dar las gracias a mis argentinas, porque sin ellas esta tesis hubiera sido diferente y porque, gracias a sus complejos he aprendido que a veces las cosas son más complejas de lo que parecen.*

*Gracias al lab-192, mi segunda casa durante este tiempo y por supuesto a sus moradores: David, Nola y Jesús a los que no puedo llamar compañeros, sino amigos. Aún recuerdo con cariño aquel día, en el que al fin empezaba la universidad. Quién me iba a decir ese día, en el aula 12 que después de tanto años, ese chico que estaba sentado a mi lado llamado David y una chica de unas filas*

*más allá, Nola, iban a acabar siendo mis compañeros de viaje. Gracias por estar ahí compartiendo innumerables e inolvidables momentos. Y gracias también a Jesús, ese compañero de escritorio con actitud protónica del que todos debiéramos aprender.*

*Un momento importante durante estos años ha sido la hora del café, necesario algunos días para despejar la cabeza, mirar las cosas desde otra perspectiva o desconectar entre risas y bromas. Por todas estas cosas quiero agradecer a los analíticos: Julia, Hugo, Wil, Ana, Bego y Lorena.*

*Gracias también a todos y cada uno de los compañeros del grupo de Análisis Instrumental y de toda el área de Química Analítica, por su ayuda y compañerismo.*

*I would like to thank Prof. Wolfgang Schubmann for giving me the opportunity of working in his research group in the Ruhr Universität Bochum. Thanks him and the rest of the group for their help, especially Edgar Ventosa for his hospitality and his friendship during those months away from home, treating to me almost like a brother. Me gustaría también dar las gracias al Prof. Wolfgang Schubmann por darme la oportunidad de trabajar durante varios meses en su grupo de investigación en la Ruhr Universität Bochum. Gracias a él y al resto de su grupo por su ayuda, especialmente a Edgar Ventosa por su hospitalidad y amistad durante esos meses lejos de casa, tratándome casi como a un hermano.*

*No puedo olvidarme de dar las gracias a mis amigos, por ser un soporte tanto en los buenos como en los malos momentos. A las galgas (Leti, Miri, Nere y Nola) a David y Rubén por todas esas quedadas, aventuras y desventuras que hemos vivido y nos quedan por vivir. Gracias también mis amigos de ayer, hoy y*



*siempre: Sandra, Guti, Nacho, Oscar, Vero, Sergio y Laura por estar ahí cuando se les necesita.*

*Por último y más importante quiero dar las gracias a los pilares que me han sostenido durante todo este tiempo y mucho antes, y sin los cuales estoy seguro de que no podría haber llegado hasta este punto: mi familia, especialmente a mis padres y mi hermano, por estar siempre ahí, por ayudarme y animarme en cada momento, por no dejarme caer nunca y confiar siempre en mí. Und natürlich Dank dir, für deinen Glauben an mich, deinen bedingungslose Unterstützung und für Sein mit mir.*



## Índice

1	Introducción .....	1
2	Fundamentos teóricos .....	7
2.1	Interfase entre dos disoluciones electrolíticas inmiscibles .....	11
2.1.1	Estructura de la interfase .....	12
2.1.2	Ecuación de Nernst.....	15
2.1.3	Tipos de ITIES .....	17
2.1.4	Reacciones de transferencia de carga en ITIES. ....	20
2.2	Orto-Vainillina .....	25
2.3	[Cu( $\theta$ -Va <sup>-</sup> ) <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> ] .....	26
2.4	Catecol.....	27
3	Metodología experimental.....	31
3.1	Técnicas.....	35
3.1.1	Espectroelectroquímica Ultravioleta-Visible .....	35
3.1.1	Espectrometría de Masas de Alta Resolución (MS-HR) .....	43
3.2	Celdas espectroelectroquímicas de UV-Visible: El estado del arte en el siglo XXI.....	46
3.2.1	Espectroelectroquímica de absorción UV-Vis .....	48
3.2.2	Celdas bidimensionales .....	85
3.3	Dispositivo experimental .....	89
3.3.1	Elementos.....	89
3.4	Electrodos .....	94

3.4.1 Electrodo de trabajo .....	94
3.4.2 Electrodo de referencia .....	97
3.4.3 Contraelectrodo .....	97
3.5 Tratamiento de datos .....	97
3.6 Dispositivos experimentales.....	98
3.6.1 Espectroelectroquímica UV-Vis en ITIES .....	98
3.6.2 Celda espectroelectroquímica para medidas espectroelectroquímicas en configuración paralela con rendija móvil. ....	102
3.6.3 Celda espectroelectroquímica bidimensional.....	104
3.6.4 Celda espectroelectroquímica de fibra óptica con electrodos de nanotubos de carbono de pared simple transferidos por presión .....	107
4 Results and Discussion.....	111
4.1 Spatial Scanning Spectroelectrochemistry at Liquid/Liquid Interfaces .....	117
4.1.1 Introduction .....	117
4.1.2 Experimental section .....	119
4.1.3 Results and discussion .....	121
4.1.4 Conclusions.....	133
4.2 Spatial Scanning Spectroelectrochemistry at solid/liquid interfaces.....	135
4.2.1 Introduction .....	135
4.2.2 Experimental section .....	136
4.2.3 Validation of the experimental set-up .....	138

4.2.4	Study of o-Vanillin electroreduction mechanism.....	141
4.2.5	Conclusions .....	149
4.3	Bidimensional Spatial Scanning Spectroelectrochemistry at solid/liquid interfaces.....	151
4.3.1	Introduction .....	151
4.3.2	Experimental section.....	153
4.3.3	Results and discussion .....	154
4.3.4	Conclusions .....	169
4.4	Optical fiber spectroelectrochemistry in parallel arrangement. ....	171
4.4.1	Introduction .....	171
4.4.2	Experimental section.....	172
4.4.3	Results and discussion .....	174
4.4.4	Conclusions .....	187
5	Conclusions.....	189
6	Bibliography .....	195
7	Appendix .....	227



# 1 INTRODUCCIÓN





El avance tecnológico que comenzó a finales del siglo XX y principios del XXI está permitiendo mejorar sensiblemente los métodos de análisis químico. Por un lado, la informática ha evolucionado extraordinariamente facilitando el uso de grandes volúmenes de datos. Por otro lado, se están desarrollando herramientas que permiten realizar experimentos que hasta hace pocos años eran casi impensables. Las baterías de diodos, la fibra óptica, los posicionadores piezoeléctricos, etc. facilitan extraordinariamente la creación de nuevos dispositivos analíticos.

Particularmente, la espectroelectroquímica se ha visto beneficiada de todos estos desarrollos tecnológicos. Nuestro grupo de investigación ha intentado aprovechar las ventajas que ofrecen estas herramientas para desarrollar nuevos dispositivos de medida que proporcionen información sobre procesos químicos de alta complejidad.

Los detectores espectrofotométricos basados en baterías de diodos permiten obtener espectros completos del proceso estudiado en cortos intervalos de tiempos, de modo que se puede conocer fácilmente la evolución de las diferentes especies químicas generadas y/o consumidas en las reacciones electroquímicas. Aunque esta gran ventaja ya ha sido aprovechada en trabajos anteriores de nuestro grupo de investigación, el gran avance de esta tesis doctoral es aprovechar los posicionadores piezoeléctricos no solo para facilitar el posicionamiento de un haz colimado de luz adyacente al electrodo con el fin de obtener información sobre las especies transformadas durante el proceso electroquímico, sino también para obtener información espectroscópica con resolución espacial cuando se realiza un control automático de la posición del haz respecto a la superficie del electrodo de trabajo. Además en esta tesis también se propone una nueva celda basada en fibra óptica que facilita sensiblemente el posicionamiento y alineación del haz de luz respecto a la superficie electrodo.

En este trabajo se han desarrollado cuatro nuevos dispositivos espectroelectroquímicos que han sido aplicados a cuatro problemas químicos

diferentes, difícilmente comprensibles utilizando únicamente técnicas electroquímicas.

La labor de desarrollo de nuevos dispositivos analíticos es a veces un tanto ingrata, pues son muchos los prototipos que deben ser construidos antes de conseguir el definitivo que suministra resultados fiables y reproducibles. Asimismo, recopilar todos los resultados en un único resumen, que es la Tesis Doctoral, daría lugar a un documento un tanto complejo y de difícil lectura. Por ello, en este trabajo se ha optado por una estructura en la que se destaquen los resultados finales de los cuatro dispositivos, dejando desplazados en gran parte los dispositivos y resultados intermedios. De este modo, se espera que el lector pueda comprender más fácilmente las bondades de nuestros dispositivos y metodologías para el estudio de sistemas complejos.

Así, en el primer capítulo se realiza una breve introducción sobre los problemas químicos que se van a abordar. El estudio (a) de interfases líquido/líquido, (b) de una molécula orgánica como la orto-vainillina (*o*-Va), (c) de un complejo organometálico como el  $[\text{Cu}(\textit{o}\text{-Va})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ , Cu-*o*-Va, de gran interés biológico, y (d) de otra molécula orgánica como el catecol presente en numerosos neurotransmisores del grupo de las catecolaminas.

El siguiente capítulo trata sobre la metodología experimental utilizada a lo largo de este trabajo, introduciendo principalmente las técnicas espectroelectroquímicas. Como en tesis doctorales previamente realizadas en el grupo de investigación se habían hecho revisiones sobre dispositivos espectroelectroquímicos desarrollados hasta el año 2000, en este trabajo se ha realizado una exhaustiva revisión sobre los dispositivos espectroelectroquímicos de absorción UV-Vis más destacables que han sido desarrollados desde ese año. En este mismo capítulo también se describen en detalle los nuevos dispositivos implementados en la presente tesis doctoral, que serán utilizados en el capítulo de resultados y discusión para el estudio de los diferentes sistemas químico.

En el último capítulo se estudian los cuatro sistemas anteriormente citados:

- a. En primer lugar se valida un nuevo dispositivo para medidas espectroelectroquímicas, basado en una rendija móvil, que permite estudiar fácilmente interfases líquido-líquido investigando la transferencia de un complejo de rutenio y bipyridina desde la fase acuosa a la fase orgánica. Posteriormente, el dispositivo se utiliza para el estudio de la electrodeposición de nanopartículas de Pd en la interfase entre dos disoluciones inmiscibles, al provocarse el depósito mediante la transferencia electrónica que tiene lugar en la reducción de una sal de Pd(II) cuando en la fase orgánica se produce la oxidación de butilferroceno.
- b. En segundo lugar se demuestra la utilidad del dispositivo basado en la rendija móvil para estudios espectroelectroquímicos en configuración paralela utilizando electrodos sólidos. Se ha validado estudiando la oxidación de *o*-tolidina. Finalmente, se ha utilizado para la elucidación del mecanismo de reducción de la *o*-Va. En este sistema, es particularmente destacable la interacción de la molécula con el superóxido que se puede generar electroquímicamente.
- c. En tercer lugar se valida el dispositivo de rendija móvil para estudios de espectroelectroquímica bidimensional utilizando nuevamente la *o*-tolidina como sistema de testeo y validación. Esta nueva configuración se ha utilizado para el estudio del mecanismo de oxidación-reducción del complejo organometálico Cu-*o*-Va.
- d. Finalmente, y en cuarto lugar, se muestra la utilidad de una nueva celda espectroelectroquímica de absorción en el UV-Vis en configuración paralela, basada en fibra óptica para comprender el mecanismo de reacción de la oxidación del catecol y resolver una mezcla difícilmente cuantificable usando electroquímica, como es la de catecol/hidroquinona.

El conjunto de experiencias mostradas en este trabajo pretenden demostrar la utilidad de los nuevos dispositivos, así como la versatilidad de estas técnicas para estudiar problemas de muy diversa naturaleza y complejidad. Sin lugar a

dudas, este trabajo solo es una presentación de las nuevas técnicas que deberán ser mejoradas con el paso de los años y podrán ser utilizadas en nuevos sistemas que permitan demostrar todo el potencial que *a priori* creemos tienen.

## 2 FUNDAMENTOS TEÓRICOS



### ❖ Objetivos del capítulo

- Exponer los conceptos básicos de los procesos que tiene lugar en los sistemas electroquímicos con interfases líquido/líquido.
- Introducir los diferentes sistemas que se estudiarán a lo largo de la tesis como son las interfases entre dos soluciones electrolíticas inmiscibles, el 2-hidroxi-3-metoxibenzaldehído, el complejo de cobre con dos ligandos 2-hidroxi-3-metoxibenzaldehído y el catecol.

### ❖ Metodología

- Búsqueda y revisión crítica y selectiva de la bibliográfica directamente vinculada con los diferentes sistemas estudiados en esta tesis.

### ❖ Resumen del capítulo

- Se han introducido los diferentes conceptos fundamentales para el seguimiento de la tesis.
  - Las interfases entre dos disoluciones electrolíticas inmiscibles son sistemas complejos pero de gran interés electroquímico por los procesos que pueden producirse en ellas. En este capítulo se han introducido los diferentes modelos propuestos sobre la estructura de la interfase líquido/líquido, además de los tipos de transferencias que pueden darse en este tipo de interfases como son la transferencia iónica, la transferencia iónica asistida y la transferencia electrónica.
  - La *orto*-vainillina tiene importantes propiedades antioxidantes, antifúngicas y antimutagénicas, o como

agente bloqueante de radicales libres, por lo que resulta de especial interés conocer su comportamiento en procesos de reducción.

- El complejo de cobre (II) con ligandos *orto*-vainillina tiene potenciales propiedades terapéuticas debido a las propiedades antioxidantes y antimutagenicas presentadas por otros complejos de cobre, propiedades que han motivado el estudio de su mecanismo de oxidación/reducción.
- El catecol forma parte de la estructura de los neurotransmisores de la familia de las catecolaminas, además de ser considerado un contaminante tóxico. Estas razones han llevado a estudiarlo con técnicas espectroelectroquímicas.



## 2.1 Interfase entre dos disoluciones electrolíticas inmiscibles

La interfase entre dos disoluciones electrolíticas inmiscibles (ITIES) es la zona límite de contacto entre dos disoluciones inmiscibles o con muy baja solubilidad entre ellas. Generalmente, una de ellas es una disolución acuosa que contiene un electrolito hidrofílico, mientras que la otra consiste en un disolvente orgánico polar, como por ejemplo 1,2-dicloroetano (1,2-DCE) o nitrobenzeno (NB) que contiene un electrolito lipofílico disuelto. El estudio de las reacciones electroquímicas y procesos que tienen lugar en la ITIES son de gran interés en múltiples campos relacionados con la química, la biología o la bioquímica, en aplicaciones tan variadas como depósito de metales en la interfase<sup>1-4</sup>, catálisis<sup>5-9</sup>, transferencia iónica a través de la interfase<sup>10-12</sup> o el estudio de fenómenos que se producen en las membranas biológicas<sup>13,14</sup> como la respiración mitocondrial o la fotosíntesis<sup>15</sup>.

El estudio de la interfase entre dos disoluciones electrolíticas inmiscibles comenzó a principios del siglo XX con los experimentos realizados por Nernst y Reisenfel donde estudiaron la transferencia iónica a través de la interfase inmiscible fenol/agua<sup>16,17</sup>. Sin embargo no fue hasta mucho más tarde, en 1939, cuando Verwey y Niessen, basándose en la teoría de Gouy<sup>18</sup> y Chapman<sup>19</sup> sobre la doble capa difusa, desarrollaron el primer estudio teórico cuantitativo de las ITIES<sup>20</sup>. No obstante, el estudio de estos sistemas estuvo estancado hasta la década de los setenta del siglo XX cuando este campo sufrió un relanzamiento. El pionero de este renovado interés en el campo fue Claude Gavach en Francia, que comenzó a aplicar métodos electroquímicos para estudiar las reacciones de transferencia de iones demostrando que las ITIES podían ser polarizadas y que la diferencia del potencial de Galvani entre las dos fases podía ser usada para conseguir reacciones de transferencia de carga<sup>21</sup>. A finales de los setenta el profesor Koryta tomó el relevo del estudio de las interfases, estudiando la polarizabilidad de las ITIES basada en la determinación de la energía libre de transferencia iónica<sup>22-25</sup>.

Posteriormente, gracias al desarrollo de los potenciostatos que permitían trabajar con cuatro electrodos realizado por Samec<sup>26–28</sup>, se consiguió solventar el problema existente de la caída óhmica en estos sistemas, lo que hizo posible la utilización de técnicas a potencial controlado como voltamperometría cíclica<sup>29–33</sup>, voltamperometría diferencial de pulso<sup>34</sup>, cronoamperometría<sup>35</sup>, polarografía<sup>36,37</sup> y espectroscopía de impedancia<sup>38,39</sup> que pudieron aportar mayor información sobre las ITIES. El estudio espectroelectroquímico de estos sistemas ha sido posible gracias a la evolución de estas técnicas y ha ayudado a lograr una mayor comprensión de las ITIES. Las técnicas espectroelectroquímicas más utilizadas para el estudio de interfases líquido/líquido (L/L) están basadas en diferentes técnicas espectroscópicas como:

- Dispersión cuasi-elástica de luz láser (QELS)<sup>40</sup>.
- Elipsometría<sup>41</sup>.
- Generación del segundo armónico (SHG)<sup>42–44</sup>.
- Generación de la frecuencia sumada (SFG)<sup>45–47</sup>.
- Espectroscopía UV-Visible<sup>48–51</sup>.
- Microscopía Raman<sup>52</sup>.
- Fluorescencia<sup>53,54</sup>.
- Reflexión de rayos X<sup>55,56</sup>.
- Reflexión de neutrones<sup>57</sup>.

### 2.1.1 Estructura de la interfase

Desde que se empezaron a estudiar los sistemas formados por una interfase entre dos líquidos inmiscible se han sugerido numerosos modelos e hipótesis y posteriores modificaciones de estos para conocer cómo es la estructura de la interfase.

Helmholtz<sup>58</sup> observó cómo cuando se ponía un conductor en contacto con una disolución electrolítica en la interfase sólido/líquido se formaba una doble

capa eléctrica. Basándose en estos estudios, Gouy y Chapman<sup>18,19</sup> desarrollaron un modelo en el que introdujeron el concepto de doble capa difusa. Con este modelo explicaron la distribución de carga iónica en la interfase sólido/líquido en función de la distancia a la citada interfase. Más adelante, Verwey y Niessen<sup>20</sup> fueron los primeros en abordar el problema de la interfase líquido/líquido desarrollando un modelo para interfases líquido-líquido basado en el de Gouy-Chapman. Este modelo explicaba que la diferencia de potencial entre las dos fases, agua-disolvente orgánico, puede ser causada tanto por la orientación de los dipolos en las proximidades a la interfase como por la presencia de un exceso de cargas libres, provocada por los iones, y separadas por la interfase. Para ello aproximaron la interfase L/L a un plano matemático, y consideraron independientes la doble capa difusa de cada una de las fases. Gavach profundizó y desarrolló a partir de ese modelo, el modelo de Verwey-Niessen Modificado (MVN)<sup>59</sup>, el cual se ajustaba con mayor exactitud, ya que considerar la interfase como un plano era un concepto físicamente erróneo. Para ello sugirió la presencia de una capa interior compacta de moléculas de disolvente entre las dos doble capas difusas (Figura 2.1).

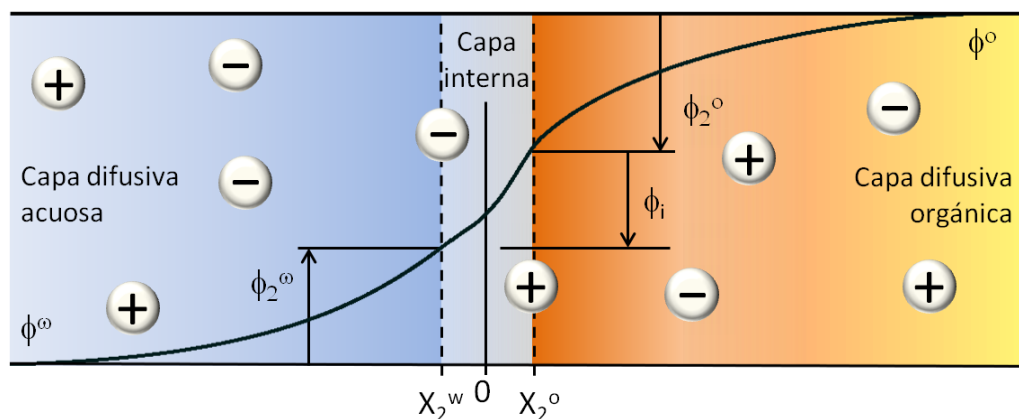


Figura 2.1 Modelo Verwey-Niessen Modificado (MVN) de las ITIES.

Siguiendo las consideraciones de este modelo la diferencia del potencial de Galvani,  $\Delta_o^a \phi$ , entre dos fases en contacto, una acuosa y otra orgánica, se divide y puede expresarse como la combinación de la contribución de la capa interna y de las capa difusas.

$$\Delta_o^a \varphi = \varphi_a - \varphi_o = \Delta_o^a \varphi_i + \varphi_2^o + \varphi_2^a \quad \text{Ecuación 2.1}$$

donde  $\varphi_a$  y  $\varphi_o$  son los potenciales eléctricos en el seno de la disolución de la fase acuosa y orgánica respectivamente,  $\Delta_o^a \varphi_i = \varphi_{x_2^a} - \varphi_{x_2^o}$  es la caída de potencial a través de la capa interna, y  $\varphi_2^a = \varphi_{x_2^a} - \varphi_a$  o  $\varphi_2^o = \varphi_{x_2^o} - \varphi_o$  son las caídas de potencial de las capas difusas de la fase acuosa y orgánica respectivamente, siempre y cuando se cumpla la condición de electroneutralidad por la que la densidad de carga superficial en ambas fases debe ser igual y opuesta<sup>60</sup>.

Sin embargo, Girault y Schiffrin<sup>61,62</sup> plantearon algunas discrepancias a este modelo debido a las dudas surgidas sobre la validez de una separación de la región interfacial en dos capas compactas. Estas dudas eran debidas a que durante estudios de tensión interfacial observaron un exceso de superficie de agua en la interfase entre disolventes orgánicos puros y electrolitos acuosos, lo que sugiere que los iones son capaces de penetrar la región interfacial. Ante esas evidencias, Girault y Schiffrin plantearon el denominado modelo de capa mixta, en el que, cuando se ponen en contacto las dos fases, en la zona de contacto entre ellas se forma una capa mixta de ambos disolventes donde las propiedades dieléctricas van cambiando suavemente de una fase a otra (Figura 2.2). Por otro lado, teniendo en cuenta los efectos de la capa difusa, Samec<sup>60</sup> había demostrado que la constante de velocidad de transferencia iónica era independiente del potencial. Uniendo las conclusiones obtenidas por Girault y Schiffrin y sus propios resultados, Samec propuso que los iones podían penetrar cierta distancia en la capa interna, aunque evitó llamar a la región de la interfase, capa mixta y siguió hablando de ella como capa interna.

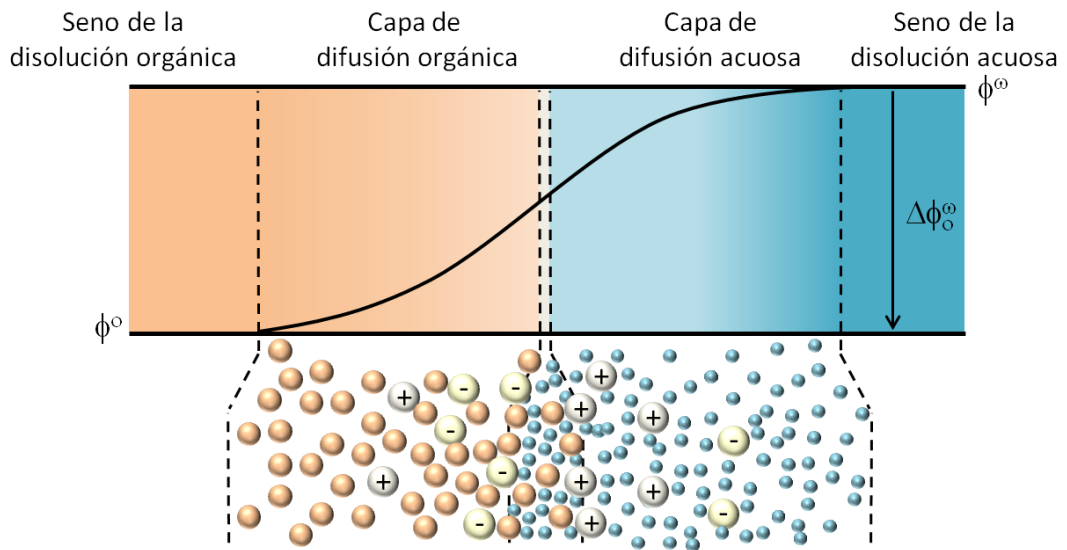


Figura 2.2 Modelo de capa mixta.

Posteriormente Torrei y Velleau<sup>63</sup> realizaron estudios teóricos mediante simulaciones computacionales con técnicas de MonteCarlo en las que observaron que había algunas consideraciones o aproximaciones erróneas en el modelo MVN. Así, en la principal aproximación de este modelo se desprecian tanto las correlaciones entre las dos regiones de carga, considerándolas independientes una de la otra, como las correlaciones ion-ion en la capa de difusiva orgánica con respecto a la acuosa. Esto se traduciría en una fuerza de atracción global entre las capas de difusión que provocaría que las capas difusas sean más delgadas y la diferencia de potencial de Galvani sea más pequeña. Hay que tener en cuenta que esta correlación "entre capas" es bastante pequeña cuando se usa agua como disolvente polar debido a su alta constante dieléctrica, pero en otros sistemas en los que se use otro disolvente polar diferente al agua esta aproximación no sería válida y se debería tener en cuenta.

### 2.1.2 Ecuación de Nernst

Cuando se ponen en contacto dos disoluciones de diferente naturaleza e inmiscibles entre sí, por ejemplo, una disolución electrolítica acuosa y otra orgánica, las diferentes especies electrolíticas presentes en cada una de las fases

tienden a distribuirse en el sistema hasta alcanzar el equilibrio termodinámico. Esta distribución de cargas en torno a la región interfacial genera una diferencia de potencial eléctrico de Galvani  $\Delta_o^a \varphi = \varphi^a - \varphi^o$ , donde  $\varphi$  es el potencial de Galvani para cada fase, que es estabilizado a través de la interfase. A presión y temperatura constante, el equilibrio termodinámico se alcanza cuando los potenciales electroquímicos entre las fases son iguales:

$$\tilde{\mu}_i^o = \tilde{\mu}_i^a \quad \text{Ecuación 2.2}$$

donde  $\tilde{\mu}_i^o$  y  $\tilde{\mu}_i^a$  representan, el potencial electroquímico de la especie cargada "i" en la fase orgánica y en la fase acuosa, respectivamente. El potencial electroquímico puede desglosarse en dos términos distintos para expresar la contribución de energía química y de energía eléctrica. De forma que la Ecuación 2.2 puede desarrollarse del siguiente modo:

$$\tilde{\mu}_i = \mu_i + \mu_i^{el} \quad \text{Ecuación 2.3}$$

$$\mu_i^{el} = z_i F \varphi \quad \text{Ecuación 2.4}$$

$$\mu_i = \mu^0 + RT \ln a_i \quad \text{Ecuación 2.5}$$

$$\mu_i^{0,a} + RT \ln a_i^a + z_i F \varphi^a = \mu_i^{0,o} + RT \ln a_i^o + z_i F \varphi^o \quad \text{Ecuación 2.6}$$

La Ecuación 2.4 representa la contribución eléctrica, es decir, el trabajo necesario para mover una partícula con carga  $z_i$  en el vacío desde el infinito al interior de la fase. Por otro lado, la Ecuación 2.5 refleja la contribución química, donde  $\mu^{0,a}$  y  $\mu^{0,o}$  es el potencial químico estándar para la fase acuosa y orgánica respectivamente,  $a_i^o$  y  $a_i^a$  son la actividades de la especie  $i$  en su respectiva fase, acuosa y orgánica respectivamente, y  $\varphi^a$  y  $\varphi^o$  es el potencial de Galvani de las fases acuosa y orgánica respectivamente. Así, la diferencia de potencial de Galvani a través de la interfase se puede expresar según la Ecuación 2.7.

$$\Delta_o^a \varphi = \frac{1}{z_i F} (\mu_i^{0,o} - \mu_i^{0,a}) \quad \text{Ecuación 2.7}$$

La condición de equilibrio de la interfase L/L puede obtenerse mediante la combinación de la Ecuación 2.6 y la Ecuación 2.7 se obtiene la ecuación de Nernst para ITIES:

$$\Delta_o^a \varphi = \Delta_o^a \varphi_i^0 + \frac{RT}{z_i F} \ln \left( \frac{a_i^o}{a_i^a} \right) \quad \text{Ecuación 2.8}$$

donde  $\Delta_o^a \varphi_i^0$  es el potencial de transferencia estándar. De hecho este potencial es la energía de Gibbs estándar de transferencia  $\Delta G_{tr,i}^{0,a \rightarrow o}$  expresada en escala de potenciales. Dado que la energía de Gibbs estándar de transferencia es igual a la diferencia entre la energía de Gibbs estándar de solvatación y la energía de Gibbs estándar de hidratación, la relación entre la diferencia de potencial de Galvani y la energía de Gibbs se expresa según la Ecuación 2.9.

$$\Delta_o^a \varphi_i^0 = \frac{\Delta G_{tr,i}^{0,a \rightarrow o}}{z_i F} \quad \text{Ecuación 2.9}$$

### 2.1.3 Tipos de ITIES

Cuando hay en contacto dos fases inmiscibles entre sí, se origina una diferencia de potencial a través de la interfase debido a la distinta densidad de carga. Por lo tanto, existe un potencial de estado estacionario detectable que no es debido a un proceso de equilibrio. Este potencial normal de transferencia iónica,  $\Delta_o^a \varphi$ , que es un parámetro fundamental que cuantifica la afinidad relativa de un ion donde ambos disolventes están en saturación mutua, puede verse modificado por tres causas, tal y como se muestra en la Figura 2.3<sup>64</sup>.

- *Las dos fases poseen una sal en común* (Figura 2.3.a), es decir son interfases no polarizables. En este caso una ligera desviación del potencial normal de transferencia iónica  $\Delta_o^a \varphi$  desde el valor del potencial normal de

transferencia iónica de equilibrio  $\Delta_o^a \varphi_{eq}$  podría inducir el paso de gran cantidad de corriente a través de la interfase.

- *Las dos fases poseen un ion en común* (Figura 2.3.b), quedando el sistema representado por un único ion con potencial determinante.
- *Las dos fases no poseen ningún ion en común* (Figura 2.3.c). Este último caso corresponde a una interfase idealmente polarizable<sup>65</sup> donde el potencial se modifica mediante un potencial externo.

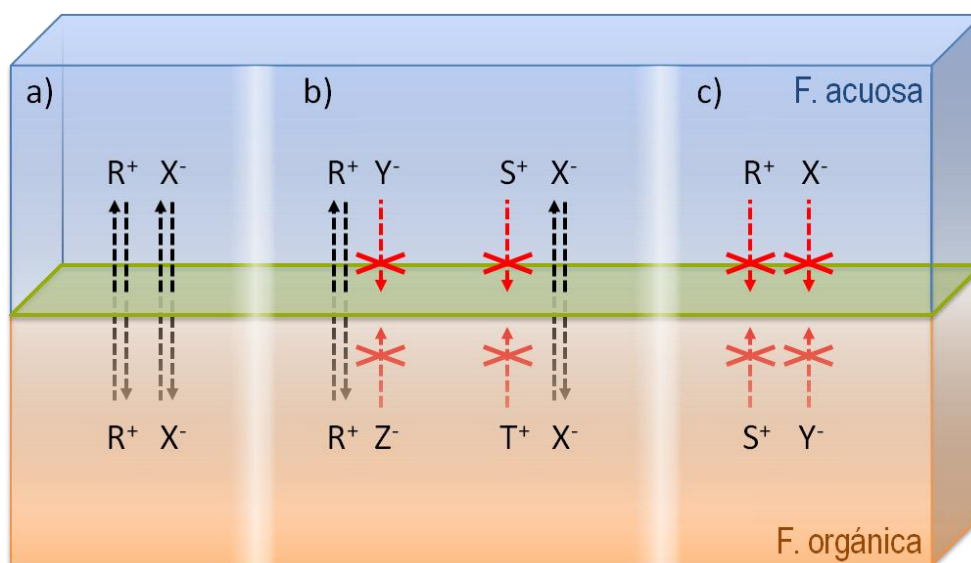


Figura 2.3 Representación esquemática de tipos de ITIES. a) Las dos fases tienen una sal en común. b) Ambas fases tienen un ion en común. c) Las dos fases no poseen ningún ion en común.

### 2.1.3.1 Interfases no polarizable

Tal y como se ha indicado antes, las interfases no polarizables se forman cuando se ponen en contacto dos disoluciones inmiscibles, en las que existe una sal en común. El ejemplo más simple de interfase no polarizable es el que presenta un electrolito binario, una sal  $RX$ , que pueda disociarse en ambas fases en sus correspondientes iones, un catión  $R^+$  y un anión  $X^-$  (Figura 2.3.a). Esquemáticamente, puede representarse como:



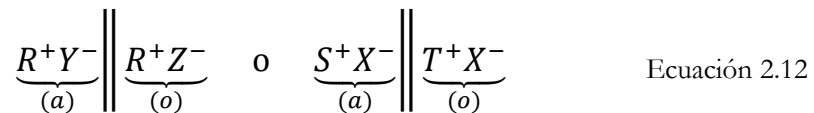


donde la doble barra vertical representa la interfase, que separa la fase acuosa (*a*) de la fase orgánica (*o*). En este caso, la diferencia de potencial de Galvani se puede escribir como:

$$\Delta_o^a \varphi = \frac{(\Delta_o^a \varphi_R^0 + \Delta_o^a \varphi_X^0)}{2} + \frac{RT}{2F} \ln \left( \frac{a_R^a + a_X^o}{a_R^o + a_X^a} \right) \quad \text{Ecuación 2.11}$$

De la Ecuación 2.11 se deduce que la diferencia del potencial de Galvani es independiente de la concentración de electrolito, lo que explica que la interfase sea electroquímicamente no polarizable.

Este tipo de interfaces no polarizables puede darse también cuando existe únicamente un ion común entre ambas fases,  $R^+$  o  $X^-$ . Los contraiones han de ser distintos y suficientemente hidrofílicos e hidrofóbicos para la fase acuosa y orgánica respectivamente, con el fin de que no puedan migrar de una fase a otra. Así, existen dos posibilidades para este tipo de interfaces:



siendo  $Y^-$  y  $Z^-$  los aniones de la fase acuosa y orgánica respectivamente cuando el ion común es un catión  $R^+$ , y  $S^+$  y  $T^+$  los cationes de la fase acuosa y orgánica respectivamente cuando el ion común es un anión  $X^-$ .

La diferencia de potencial de Galvani viene determinada por la relación de actividades del ion común en ambas fases.

$$\Delta_o^a \varphi = \varphi_R^0 + \frac{RT}{z_R F} \ln \left( \frac{a_R^a}{a_R^o} \right) \quad \text{o} \quad \Delta_o^a \varphi = \varphi_X^0 + \frac{RT}{z_X F} \ln \left( \frac{a_X^a}{a_X^o} \right) \quad \text{Ecuación 2.13}$$

### 2.1.3.2 ITIES idealmente polarizable

Se produce al poner en contacto dos disoluciones inmiscibles entre sí que contienen electrolitos distintos, estando constituido el electrolito de la fase acuosa por cationes  $R^+$  y aniones  $X^-$  hidrofílicos y el electrolito de la fase orgánica por cationes  $S^+$  y aniones  $Y^-$  lipofílicos. De forma que cuando las energías de Gibbs estándar de transferencia son positivas los iones del electrolito de la fase acuosa pasan a la fase orgánica, mientras que cuando son negativas son los iones del electrolito de la fase orgánica los que pasan a la fase acuosa. La diferencia de potencial  $\Delta_o^a \varphi_i^0$  en estos sistemas está controlada por el exceso de carga en la región interfacial, la cual puede ser modulada por una fuente externa.



### 2.1.4 Reacciones de transferencia de carga en ITIES

En ITIES se puede estudiar una gran variedad de reacciones de transferencia de carga utilizando técnicas electroquímicas. Estas reacciones de transferencia de carga pueden clasificarse en tres categorías principales<sup>66,67</sup> representadas esquemáticamente en la Figura 2.4:

- Transferencia iónica, (Figura 2.4.a).
- Transferencia iónica asistida, (Figura 2.4.b).
- Transferencia eléctrica, (Figura 2.4.c).

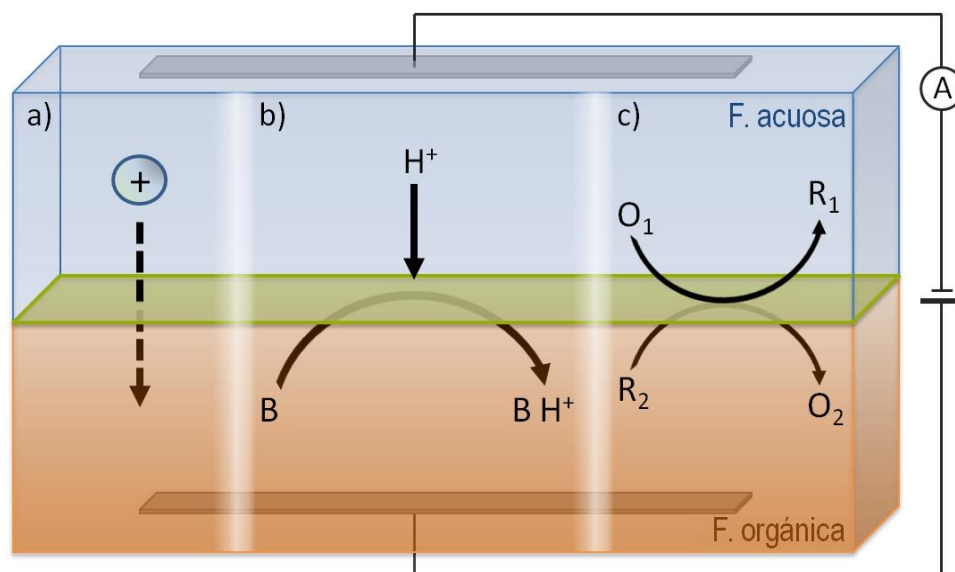


Figura 2.4 Representación esquemática de las reacciones de transferencia de carga en ITIES. a) Transferencia iónica, b) transferencia iónica asistida, c) transferencia electrónica.

#### 2.1.4.1 Transferencia iónica

Las reacciones de transferencia iónica en ITIES han sido ampliamente estudiadas en las últimas décadas, ya que son las reacciones más sencillas de estudiar en estos sistemas. Para que se produzca la transferencia iónica es necesario proporcionar la energía de Gibbs de transferencia para que el ion pueda migrar de una fase a otra, o en otras palabras, producir una diferencia de potencial suficiente entre ambas fases como para que el ion se traslade de la fase en la que se encuentra a la otra, Ecuación 2.8. Generalmente los estudios de las reacciones de transferencia iónica se han centrado en determinar la constante de velocidad de la transferencia iónica.

La transferencia iónica se puede dividir en tres etapas:

1. Transferencia de masa desde el seno de la fase en la que se encuentra el ion a la interfase. Este paso está controlado principalmente por difusión.

2. Reacción de transferencia iónica en la interfase, es decir, el paso de los iones a través de la interfase. Samec<sup>68</sup> apuntó que ésta es la etapa determinante para el cálculo de la velocidad de transferencia.
3. Transferencia de masa desde la interfase hacia el seno de la disolución de la nueva fase.

Hay que tener en cuenta que la constante estándar de velocidad para la transferencia iónica es directamente proporcional al coeficiente de difusión de la especie y dependiente del potencial. La fuerza conductora para la reacción de transferencia electrónica está localizada en la interfase y la variación de la energía de activación, la diferencia de potencial de Galvani, es una fracción de la variación de la fuerza eléctrica conductora.

#### 2.1.4.2 Transferencia iónica asistida

El primer estudio de transferencia iónica asistida fue llevado a cabo en 1979 por Koryta<sup>22</sup>, en el cual estudió la transferencia de iones potasio facilitada por éteres corona ionóforos. El mecanismo de las reacciones de transferencia asistida de iones no es único, ya que depende de diferentes factores como las concentraciones del ion y del ligando en ambas fases, o de los equilibrios de complejación tanto en la fase acuosa como en la orgánica. Por lo que dependiendo de estos factores, se pueden producir cuatro situaciones diferentes<sup>69</sup>, Figura 2.5:

- **ACT:** *Complejación acuosa seguida por transferencia.* En este caso, el ligando se encuentra en la fase orgánica y la reacción de transferencia iónica asistida tiene lugar por medio de la difusión del ionóforo desde la fase orgánica a la acuosa seguida por complejación con el ion en la fase acuosa y la posterior transferencia del ion complejado. Este caso solo es posible cuando el ligando es soluble en ambas fases.
- **TOC:** *Transferencia seguida por complejación en la fase orgánica.* En este caso el mecanismo sería equivalente a un mecanismo electroquímico sobre la

superficie de un electrodo. El ion es transferido desde la fase acuosa a la orgánica, en la que a continuación se produce la complejación con el ligando.

- **TIC:** *Transferencia mediante complejación en la interfase.* Este tipo de mecanismo a diferencia de los dos anteriores ocurre en un solo paso. El ion se aproxima a la interfase y es ahí, donde se produce la complejación con el ligando ionóforo, permitiendo que el complejo se transfiera a la otra fase.
- **TID:** *Transferencia mediante disociación en la interfase.* Este caso al igual que el anterior ocurre en un único paso, pero a diferencia del resto de procesos, el ion está complejado inicialmente y es al llegar a la interfase cuando se descompleja permitiendo la transferencia del ion a la otra fase.

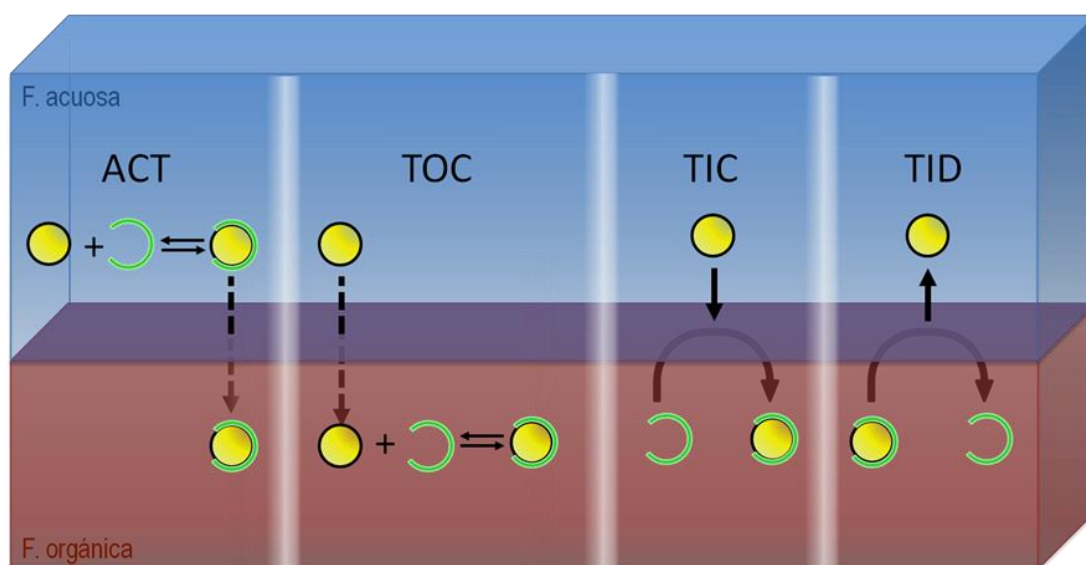


Figura 2.5 Representación esquemática de los diferentes tipos de transferencia iónica asistida.

#### 2.1.4.3 Transferencia electrónica

Las reacciones de transferencia electrónica heterogénea en ITIES están relacionadas con el paso de una corriente eléctrica a través de la interfase L/L. El

proceso se lleva a cabo mediante la oxidación de un par redox en una fase produciéndose una transferencia de electrones a través de la interfase, generando la consiguiente reducción de una segunda especie en la otra fase. Esto requiere que ambas especies estén cerca de la región interfacial, para que la transferencia electrónica entre una fase y la otra sea posible, Figura 2.6.

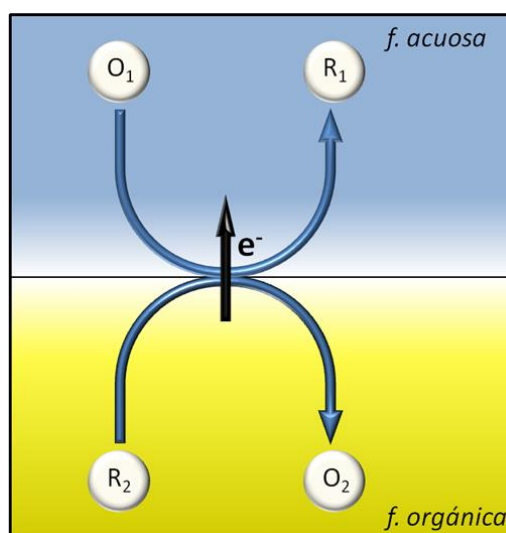
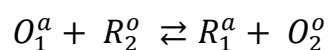


Figura 2.6 Representación esquemática de un proceso de transferencia electrónica a través ITIES.

En el capítulo 4.1 se estudiará la aplicación de este tipo de procesos para la generación de nanopartículas de Pd en la interfase L/L. Cuando en una de las fases se introduce una especie que al ser reducida genera un metal, se puede provocar su depósito en la interfase mediante una reacción de transferencia electrónica con una especie que se oxide en la otra fase. Como se demostrará en el citado capítulo, este tipo de sistemas puede ser estudiado fácilmente con uno de los nuevos dispositivos espectroelectroquímicos desarrollados en este trabajo.

## 2.2 Orto-Vainillina

Uno de los compuestos estudiados en la presente tesis doctoral es la orto-vainillina (2-hidroxi-3-metoxibenzaldehído), Figura 2.7. Las bases de Schiff son grupos funcionales que contienen al menos un doble enlace nitrógeno-carbono unido por el nitrógeno a un grupo arilo. Estos compuestos fueron sintetizados por primera vez por Hugo Schiff en la segunda mitad del siglo XIX<sup>70</sup>. Desde entonces, estos compuestos han sido ampliamente estudiados tanto al actuar de forma aislada como al complejarse con iones de metales de transición<sup>71,72</sup> ya que pueden exhibir propiedades muy interesantes como son:

- Actividad catalítica<sup>73-76</sup>.
- Actividad antibacteriana<sup>77-79</sup>.
- Actividad antifúngica<sup>80-82</sup>.
- Actividad antiviral<sup>83-85</sup>.
- Actividad antitumoral y anticancerígena<sup>86-89</sup>.

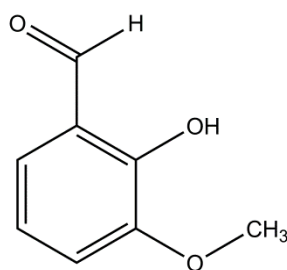


Figura 2.7 Molécula de orto-vainillina (2-hidroxi-3-metoxibenzaldehído).

Debido a la importancia de estos complejos de bases de Schiff se ha decidido estudiar mediante una de las celdas desarrolladas en esta tesis la molécula orto-vainillina (*o*-Va), Figura 2.7. Ésta es una de las moléculas que más ampliamente ha sido utilizada como reactivo de partida para sintetizar un gran número de bases de Schiff<sup>80,90-93</sup>, que posteriormente se utilizaran para crear complejos metálicos de base de Schiff<sup>94-96</sup>.

La orto-vainillina, es un isómero posicional de la vainillina (3-hidroxi-4-metoxibenzaldehído), ambos complejos están presentes de forma natural en el extracto de aceites esenciales de varias plantas. A diferencia de la vainillina, que se ha utilizado desde la antigüedad como saborizante de alimentos, el *o*-Va no tiene un sabor característico e intenso a vainilla, por lo que es menos común encontrarlo como aditivo en alimentos. El *o*-Va fue aislado por primera vez por Tiemann en la segunda mitad del siglo XIX<sup>97,98</sup>. Desde entonces ha sido ampliamente estudiado por ser utilizado como precursor de bases de Schiff, y por sus propiedades antifúngicas<sup>99</sup>, antibacterianas<sup>93</sup>, antioxidantes<sup>100</sup> eliminando la actividad de radicales libres, antimutagénicas<sup>101</sup> debido a que induce la inhibición tanto de la metástasis como la invasión y migración de células cancerígenas, e incluso ha sido utilizado en otros campos como inhibidor de la corrosión<sup>102-104</sup> o precursor de éstos para distintos metales. Al ser un compuesto de múltiples usos, sobre todo por sus propiedades antibacterianas y su potencial antitumoral ha sido ampliamente estudiado como ligando para formar complejos organometálicos, en vez de utilizar una base de Schiff con distintos centros metálicos como el zinc<sup>77</sup>, cobre<sup>87,90</sup>, níquel<sup>105</sup> rutenio<sup>106</sup>.

### 2.3 [Cu(*o*-Va)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>]

En este trabajo se ha utilizado la espectroelectroquímica bidimensional para estudiar más a fondo el comportamiento de un complejo organometálico, el [Cu(*o*-Va)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>], que a partir de ahora denominaremos Cu-*o*-Va. Está formado por un centro metálico de cobre (II) en una estructura octaédrica, siendo los ligandos de la posiciones ecuatoriales dos *o*-vainillatos, y estando ocupadas las posiciones axiales por moléculas de agua, quedando una estructura como la que se muestra en la Figura 2.8.



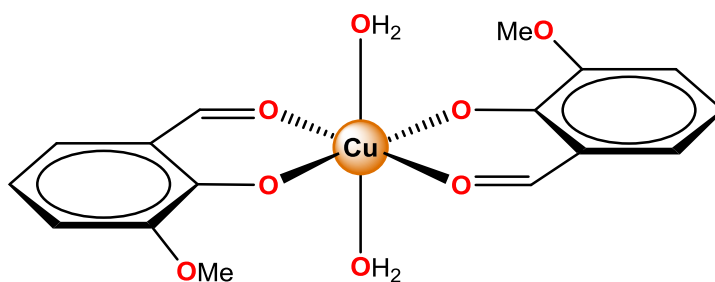


Figura 2.8 Molécula de  $[\text{Cu}(\text{o-Va})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ .

Este complejo ha sido elegido para su estudio por sus potenciales propiedades terapéuticas. Es bien conocido que numerosos complejos de metales de transición de la primera fila<sup>107,108</sup> poseen propiedades biológicas. En el caso del cobre, se sabe que es un micronutriente esencial ya que posee propiedades tanto antioxidantes como prooxidantes, además se encuentra en varias proteínas y enzimas así como en diversas rutas metabólicas. Se conocen complejos de cobre que han demostrado poseer propiedades terapéuticas interesantes pudiendo actuar como antioxidantes<sup>109,110</sup>, antiinflamatorios<sup>111,112</sup> o agentes antitumorales<sup>113</sup> debido a que el cobre es capaz de aumentar la actividad y la eficiencia de estas propiedades terapéuticas<sup>114</sup>. Como hemos explicado anteriormente la molécula de *o*-Va también exhibe determinadas propiedades terapéuticas, por lo que la elección de este complejo se debe a la posibilidad de que la combinación del cobre y del ligando, pueda potenciar las propiedades antioxidantes y antimutagénicas.

## 2.4 Catecol

El catecol o 1,2-dihidroxibenceno, Figura 2.9, es un compuesto orgánico presente en la naturaleza. Fue aislado por primera vez en 1839 por E.H.E Reinsch<sup>115</sup> mediante destilación de un extracto concentrado de *Mimosa Catechu*, un tipo de acacia originaria de sudeste asiático.

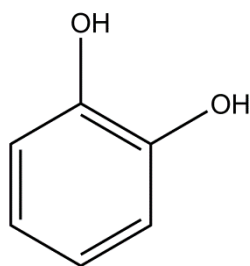


Figura 2.9 Molécula de catecol.

La determinación de catecol es de gran importancia debido a que los dihidroxibencenos son ampliamente empleados por las industrias farmacéutica cosmética o alimentaria<sup>116-118</sup>. Sin embargo estos compuestos son considerados productos contaminantes debido a su alta toxicidad en el medio ambiente y su baja degradabilidad<sup>119,120</sup>.

El catecol y sus derivados han demostrado que funcionan como antioxidantes naturales y como bloqueadores de radicales libres<sup>121-123</sup>. El catecol ha sido ampliamente utilizado para el estudio de complejos con capacidad catecol-oxidasa y catecol-o-metiltransferasa y como estructura base de catecolaminas, compuestas al menos por un grupo catecol y un grupo amina. Pese a que la ruta sintética natural de las catecolaminas no parte del catecol, sino que su precursor suele ser la tirosina se han desarrollado rutas sintéticas para obtener catecolaminas a partir de la oxidación de catecol en presencia de diferentes aminas<sup>124</sup>.

El estudio del catecol y de las catecolaminas es de gran interés debido a su importancia biológica puesto que algunas de ellas como la adrenalina la noradrenalina o la dopamina (Figura 2.10), actúan como neurotransmisores y están relacionadas con procesos fisiológicos, cognitivos y hormonales.

Aunque en este trabajo solo se va a estudiar el catecol y no las catecolaminas es interesante conocer algunas peculiaridades de algunas catecolaminas presentes en nuestro organismo porque comprender los mecanismos de oxidación del catecol puede ayudar a comprender en parte los mecanismos de oxidación de estas biomoléculas.

La dopamina ha sido uno de los neurotransmisores más estudiados debido a la gran cantidad de procesos fisiológicos con los que se relaciona, como por ejemplo, el placer, el sueño, la memoria o el movimiento entre otros, y debido a su implicación en el desarrollo de enfermedades como la enfermedad de Huntington o el Parkinson<sup>125</sup>. La falta de dopamina en el ser humano puede producir falta de coordinación o lentitud en los movimientos, sin embargo un exceso de ésta ha demostrado la aparición de tics involuntarios<sup>126</sup>. De hecho, se han relacionado determinados síntomas del Parkinson con la pérdida de neuronas dopaminérgicas, y se ha observado como fármacos agonistas de dopamina reducen estos efectos en algunos pacientes<sup>127</sup>.

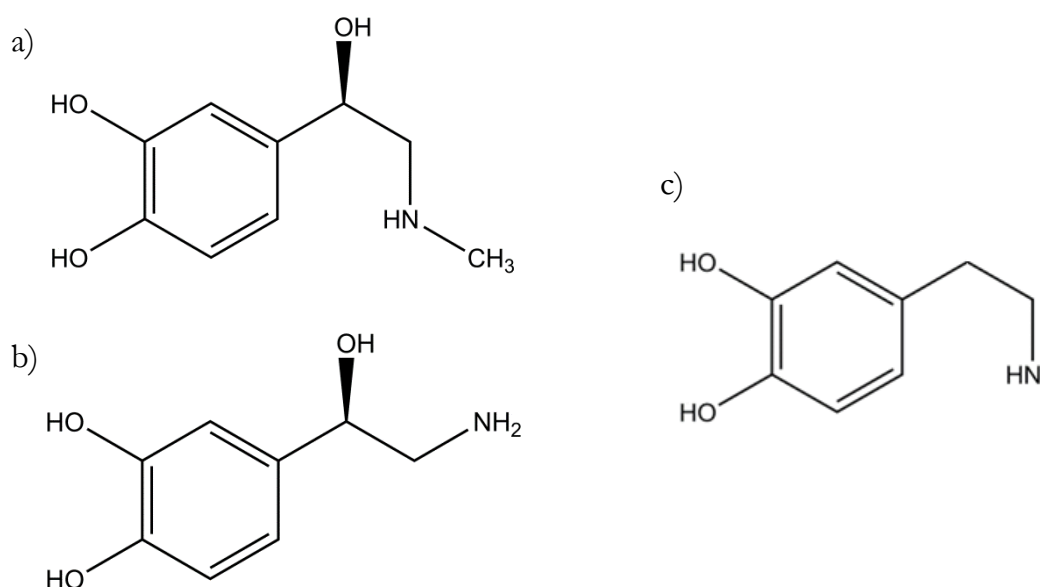


Figura 2.10 Catecolaminas que actúan como neurotransmisores: a) adrenalina, b) noradrenalina y c) dopamina.

La oxidación electroquímica del catecol se produce mediante una reacción quasi-reversible de 2 electrones para generar 1,2-benzoquinona<sup>128</sup> pudiendo reaccionar una molécula ya generada de 1,2-benzoquinona con una molécula de catecol produciéndose reacciones de polimerización.

Sin embargo, en muchas ocasiones la determinación de catecol puede ser complicada debido a la existencia en el medio de interferentes. Uno de ellos es la hidroquinona, Figura 2.11, un isómero posicional del catecol, la cual presenta señales muy similares al catecol tanto electroquímicas<sup>129</sup> como espectroscópicas<sup>130</sup> estando superpuestos tanto los picos voltamperométricos como las bandas de absorción. Debido a esto se han realizado numerosos estudios con el fin de determinar la concentración de estos compuestos en mezclas y matrices complejas<sup>131</sup>. Para la determinación electroquímica se ha optado mayoritariamente por la modificación del electrodo de trabajo<sup>132,133</sup> de forma que se pueda conseguir una mayor separación de picos, y para las técnicas espectroscópicas se ha optado por el acoplamiento de técnicas cromatográficas<sup>134</sup> o el uso del método de la adición estándar del punto H que permite obviar el efecto de los interferentes<sup>135</sup>.

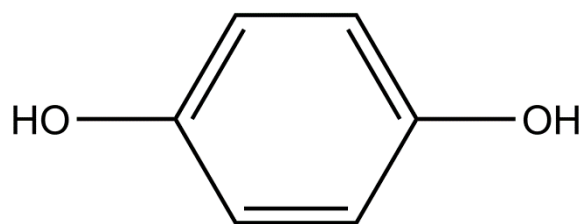


Figura 2.11 Molécula de hidroquinona.

### **3 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL**



### ◆ **Objetivos del capítulo**

- Describir los fundamentos de las técnicas analíticas utilizadas en esta tesis doctoral.
- Realizar una revisión de las diferentes celdas espectroelectroquímicas de ultravioleta-visible desarrolladas desde el año 2000 hasta nuestros días.
- Describir detalladamente los montajes espectroelectroquímicos experimentales y las celdas desarrolladas.

### ◆ **Metodología**

- Descripción de los fundamentos de las celdas y montajes experimentales utilizados en los estudios durante la tesis doctoral.
- Búsqueda y revisión crítica y selectiva de la bibliografía vinculada al desarrollo de celdas espectroelectroquímicas de ultravioleta-visible desde el año 2000.
- Todos los montajes experimentales y celdas desarrollados en esta tesis doctoral han seguido las etapas de diseño, optimización y validación para garantizar su correcto funcionamiento. Aunque no todos los experimentos de estas etapas son mostrados en la memoria para no alargar su extensión, se podrá comprobar su correcto funcionamiento a la vista de los resultados mostrados en el capítulo de resultados y discusión.

◆ **Resumen del capítulo**

- Para comprender hacia donde se dirige este campo es necesario conocer los últimos avances y nuevas celdas que han sido desarrolladas para la espectroelectroquímica de absorción UV-Vis. Para ello se presenta una revisión de las celdas desarrolladas desde el año 2000 para el estudio espectroelectroquímico en reflexión, en transmisión y las celdas de espectroelectroquímica bidimensional.
- Se presentan los montajes experimentales, los dispositivos y las celdas desarrolladas para los sistemas de estudio propuestos.
- Se han descrito los distintos equipos electroquímicos y espectroscópicos utilizados durante el desarrollo de la tesis.
- Se ha seleccionado también la espectrometría de masas como técnica de caracterización *ex-situ*.
- El tratamiento de los resultados experimentales ha sido realizado con el programa matemático Matlab.



## 3.1 Técnicas

### 3.1.1 *Espectroelectroquímica Ultravioleta-Visible*

La Química Analítica puede definirse como la rama de la química que tiene como finalidad el estudio tanto de la composición química de un material o muestra, como de procesos químicos, utilizando diferentes técnicas y métodos analíticos. Son múltiples las técnicas analíticas desarrolladas que han evolucionado y se han adaptado a las nuevas necesidades y/o problemas que el campo del análisis, en general, ha ido planteando. La espectroscopía y la electroquímica son dos de esas técnicas analíticas, ampliamente usadas tanto para la determinación de diferentes analitos<sup>136,137</sup> como para la obtención de información relevante sobre los mecanismos de reacción. Así han ayudado a elucidar los diferentes procesos que se producen durante la reacción del compuesto estudiado<sup>138-141</sup>, así como a cuantificar analitos de naturalezas muy diferentes en medios altamente complejos.

A mediados de los años sesenta del siglo XX Kuwana<sup>142</sup> propuso acoplar ambas técnicas, regidas por principios muy diferentes y donde los parámetros medidos son claramente distintos, para desarrollar una nueva técnica analítica denominada espectroelectroquímica. Para ello, propuso el uso de electrodos ópticamente transparentes de óxidos metálicos semiconductores con el fin de llevar a cabo el seguimiento de reacciones de transferencia electrónica midiendo simultáneamente las variaciones de absorbancia que se producen en el medio de reacción cuando un haz de radiación visible atravesaba el electrodo. Esta nueva técnica que acopla la electroquímica y la espectroscopía, supone una mejora sustancial de los resultados recogidos de forma individual por cada una de ellas. La razón principal es que los datos espectroscópicos y electroquímicos son registrados de forma sincronizada y la información suministrada es complementaria entre sí. Esto ayuda a estudiar sistemas o procesos altamente

complejos que con estas técnicas utilizadas de forma separada, serían difíciles de determinar. Desde ese momento, la espectroelectroquímica ha ido cobrando cada vez más importancia en el estudio de procesos químicos complejos<sup>143,144</sup>, en la caracterización de especies<sup>145,146</sup>, o en la cuantificación de diferentes analitos obteniéndose en un solo experimento información muy completa sobre el sistema estudiado. Este hecho se refleja en la gran cantidad de artículos publicados en los últimos años donde se aplican a todo tipo de sistemas, en las múltiples revisiones que se han realizado de estas técnicas<sup>147-153</sup>, así como en su aparición en libros de referencia básica en electroquímica<sup>65,154,155</sup>.

Desde que Kuwana propusiera esta técnica, la espectroelectroquímica, ha sido utilizada básicamente de dos modos. Por un lado están los estudios denominados *in-situ* en los que ambas medidas son realizadas simultáneamente (*in-situ*) sobre una misma muestra, proporcionando dos señales independientes entre sí pero relacionadas con el mismo proceso. En este caso se puede hablar realmente de una verdadera técnica dual, es decir, de una auténtica técnica multirrespuesta. Por otro lado se encuentran los llamados estudios *ex situ*. En ellos, se registran espectros de un determinado sistema sometido a una reacción de oxidación o reducción solo cuando el sistema alcanza un cierto estado de equilibrio, por ejemplo cuando se produce electrolisis total o parcial de una especie en un medio determinado. Es decir, se aplica por ejemplo un potencial al sistema y cuando se alcanza el equilibrio se toma el espectro de la disolución. En estos casos, al no registrarse de forma directa y sincrónica ambas señales, es muy difícil tener la certeza absoluta de que los datos obtenidos corresponden al mismo proceso, ya que es imposible conocer si el sistema ha evolucionado o no en el tiempo transcurrido entre el uso de una técnica y la otra. Por lo tanto, en este segundo caso, no se pueden llamar propiamente de técnicas espectroelectroquímicas.

Las técnicas espectroelectroquímicas pueden utilizar diferentes métodos espectroscópicos. Los más utilizados suelen ser:

- Espectroscopía de absorción
  - Ultravioleta-visible (UV-Vis).
  - Infrarrojo cercano<sup>156</sup>.
  - Infrarrojo (IR)<sup>157–160</sup>.
- Espectroscopía Raman<sup>161–164</sup>.
- Resonancia paramagnética electrónica (EPR)<sup>165</sup>.
- Rayos X<sup>166</sup>.
- Fluorescencia<sup>167–172</sup>.

Dependiendo de las necesidades requeridas en el seguimiento de cada sistema para detectar información adicional de los procesos producidos como consecuencia de la aplicación de un potencial o intensidad de corriente.

Por otro lado existe una variedad de métodos electroquímicos que se pueden elegir en función del estudio que se quiera realizar. Las más utilizadas son:

- Voltamperometría cíclica<sup>173–175</sup>.
- Cronoamperometría<sup>176–178</sup>.
- Potenciometría<sup>179–181</sup>.

Además, la espectroelectroquímica ha sido también combinada con otras técnicas más complejas como la Microbalanza de Cristal de Cuarzo<sup>182–185</sup>.

Puesto que hasta hace poco no existía ningún dispositivo comercial para realizar medidas espectroelectroquímicas, han sido muchos los grupos que han utilizado este tipo de técnica multirrespuesta desarrollando sus propias celdas y dispositivos de medida. Las técnicas más utilizadas y para las que más desarrollos instrumentales de medida se han propuesto son la espectroelectroquímica

Raman, la espectroelectroquímica mediante reflexión total atenuada (ATR), y la espectroelectroquímica de absorción en el UV-Visible. Dentro de este último grupo se pueden encontrar dos propuestas de trabajo claramente diferentes en cuanto al modo de realizar la experiencia y al tipo de información registrada:

- La *espectroelectroquímica en configuración normal*, en la que el haz de radiación incide en dirección normal a la superficie del electrodo de trabajo (Figura 3.1.a).
- La *espectroelectroquímica en configuración paralela*, en la que el haz de radiación atraviesa la disolución en dirección paralela al electrodo (Figura 3.1.b).

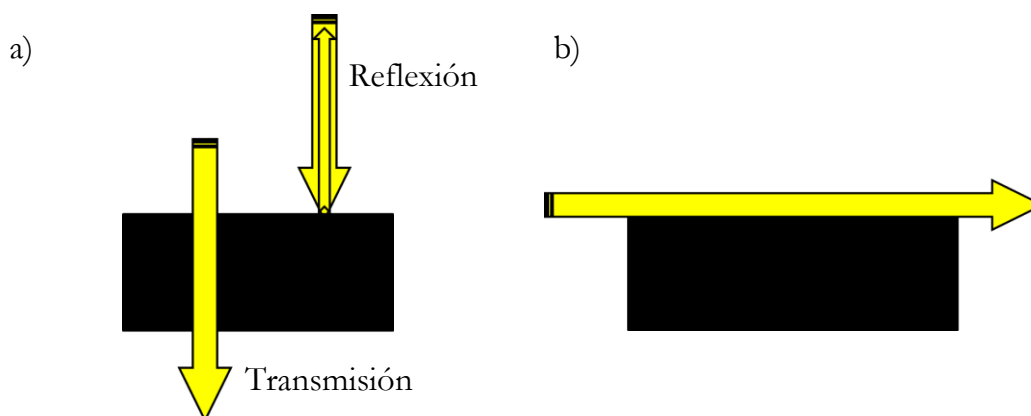


Figura 3.1 Esquema del paso del haz de radiación cuando se trabaja a) en configuración normal, y b) en configuración paralela.

### 3.1.1.1 Espectroelectroquímica en configuración normal

Las técnicas espectroelectroquímicas en configuración normal pueden llevarse a cabo tanto en transmisión, como en reflexión. Para los estudios en transmisión es necesario la utilización de electrodos ópticamente transparentes (OTE), de forma que la luz pueda atravesar la superficie del electrodo y ser recogida la luz transmitida por el correspondiente detector. Los materiales más utilizados para este tipo de electrodos OTE son el óxido de indio y estaño (ITO)<sup>186–188</sup>, las películas finas de oro<sup>189,190</sup> o las mallas metálicas de oro<sup>191–193</sup> o

platino<sup>194-196</sup>. En cambio, para los estudios realizados en reflexión se utilizan electrodos capaces de reflejar el haz de radiación sobre su superficie, generalmente son electrodos de oro, platino o carbón vítreo.

Los estudios espectroscópicos de absorción molecular utilizan la conocida ley de Lambert-Beer:

$$A_N = \log \left( \frac{I_0}{I} \right) = \varepsilon \ell c \quad \text{Ecuación 3.1}$$

siendo  $A_N$  la absorbancia en configuración normal,  $I_0$  la intensidad inicial,  $I$  la intensidad final,  $\varepsilon$  el coeficiente de absorción molar,  $\ell$  la longitud del camino óptico, y  $c$  la concentración. Cuando se provoca una reacción electroquímica en la superficie del electrodo de trabajo y no se alcanza el estado estacionario la distribución de las especies en la interfase electrodo/disolución es heterogénea, aspecto a tener en cuenta cuando se realizan experimentos electroquímicos ya que no se puede aplicar directamente la ley de Lambert-Beer. Así, en configuración normal, se pueden realizar la aproximación de suponer que la disolución está dividida en  $n$  capas suficiente finas, en las cuales la concentración de la especie absorbente es homogénea y estable, (Figura 3.2). De este modo, la absorbancia total ( $A_N$ ) en la interfase electrodo/disolución se puede calcular como la suma de las absorbancias individuales ( $A_i$ ) de cada una de esas capas<sup>197</sup>.

$$A_N = A_1 + A_2 + A_3 + \dots + A_n = \varepsilon \ell c_1 + \varepsilon \ell c_2 + \varepsilon \ell c_3 + \dots + \varepsilon \ell c_n$$

$$A_N = \log \left( \frac{I_0}{I_n} \right) = \frac{\varepsilon \ell}{n} \sum_{i=1}^n c_i \quad \text{Ecuación 3.2}$$

Cuando la experiencia electroquímica, se realiza en configuración normal en reflexión, hay que tener en cuenta que el haz de radiación atraviesa dos veces cada una de las  $n$  capas. Así, la relación entre absorbancia y concentración

mostrada en la Ecuación 3.2, se transforma en la Ecuación 3.4 en experiencias en reflexión.

$$A_N = \log\left(\frac{I_0}{I_n}\right) + \log\left(\frac{I_n}{I_{2n}}\right) = \frac{\varepsilon \ell}{n} \sum_{i=1}^n c_i + \frac{\varepsilon \ell}{n} \sum_{i=1}^n c_i \quad \text{Ecuación 3.3}$$

$$A_N = \log\left(\frac{I_0}{I_{2n}}\right) = \frac{2\varepsilon \ell}{n} \sum_{i=1}^n c_i \quad \text{Ecuación 3.4}$$

Las señales absorciométricas registradas durante un experimento espectroelectroquímico en configuración normal contienen información relacionada con los procesos faradaicos que se producen, tanto sobre la superficie del electrodo como en la disolución adyacente al mismo.

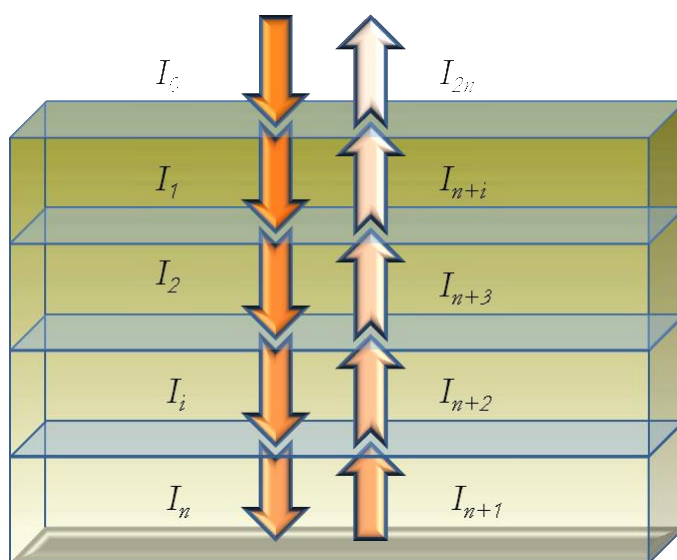


Figura 3.2 Representación esquemática de la atenuación progresiva del haz de radiación al atravesar las distintas capas en los que se divide la disolución en configuración normal.

### 3.1.1.2 Espectroelectroquímica en configuración paralela

Las técnicas espectroelectroquímicas en configuración paralela se llevan a cabo en transmisión y suelen ser aplicadas usando las denominadas celdas de

largo camino óptico. En este caso, el haz de radiación se hace incidir paralelamente a la superficie del electrodo atravesando la disolución adyacente al electrodo. La sensibilidad de estas medidas es claramente mayor que las realizadas en configuración normal, ya que el camino óptico puede llegar a ser tan largo como la longitud del electrodo de trabajo, muy superior al de la capa de difusión.

En esta configuración hay que tener en cuenta la heterogeneidad en cuanto a la distribución de las especies absorbentes en la interfase electrodo/disolución (Figura 3.3). Al igual que en configuración normal, se debe suponer la disolución adyacente a la superficie electródica dividida en  $n$  capas, donde esta heterogeneidad no existe. Además el haz de radiación incidente se debe suponer dividido en  $n$  rayos, cada uno de ellos atravesando una de las  $n$  capas de disolución. Con esta aproximación, la ley de Lambert-Beer<sup>198</sup> puede aplicarse en cada una de las capas en la que se ha dividido la disolución y se ha supuesto que la concentración de la especie absorbente es constante. Por lo tanto, la relación entre la absorbancia en configuración paralela ( $A_p$ ) y la concentración se puede expresar con la siguiente ecuación<sup>199</sup>:

$$A_p = \log \left( \frac{\omega}{\int_0^\omega 10^{-\varepsilon \ell c(x)} dx} \right) \quad \text{Ecuación 3.5}$$

donde  $\omega$  es el espesor de la capa de difusión por la que pasa el haz de radiación incidente,  $c(x)$  la concentración en cada una de las capas en las que se ha dividido la disolución muestreada, teniendo los demás símbolos su significado habitual. Considerando que el número de fracciones en las que se divide el sistema es limitado, la ecuación integral puede obtenerse en forma discreta:

$$A = \log \left( \frac{I_0}{I} \right) = \log n - \log \sum_{i=1}^n 10^{-\varepsilon \ell c_i} \quad \text{Ecuación 3.6}$$

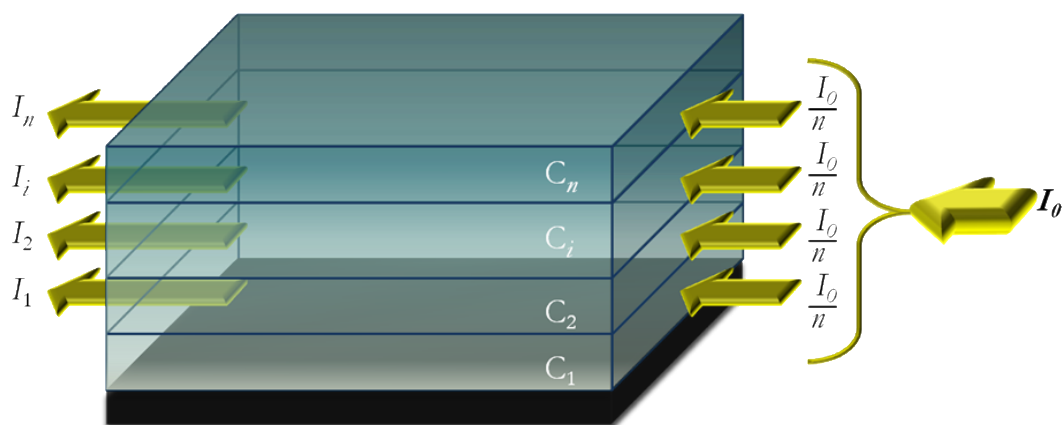


Figura 3.3 Representación esquemática del paso del haz de radiación en configuración paralelo a través de la disolución adyacente al electrodo.

Si bien es cierto que la configuración paralela no permite ver los procesos que acontecen en la superficie del electrodo, la señal espectroscópica obtenida para las especies presentes en la disolución adyacente a la superficie de electrodo es más sensible debido a la mayor longitud de camino óptico que ofrece esta configuración. Otra diferencia entre ambas configuraciones es que en paralelo se puede tener una idea de la distribución de la especie absorbente en la capa de difusión, aspecto no abordable cuando se trabaja en normal.

### 3.1.1.3 Espectroelectroquímica bidimensional

La espectroelectroquímica bidimensional es una nueva técnica espectroelectroquímica propuesta en 2001<sup>200</sup>. Se basa en medir de forma simultánea la señal electroquímica, y dos señales espectroscópicas en cada una de las dos configuraciones descritas previamente, normal y paralelo. Así, un haz de radiación atraviesa la disolución adyacente al electrodo en una dirección paralela a éste, y otro haz de radiación incide perpendicularmente a la superficie del electrodo.

Esta técnica permite obtener una información más completa y exacta sobre el sistema estudiado, como se ha explicado anteriormente la información extraída de la señal óptica depende de la configuración en la que el haz de luz atraviesa la



disolución. Con la espectroelectroquímica bidimensional es posible obtener, en un solo experimento y de forma separada, tanto información relacionada con los procesos que ocurren en la disolución adyacente al electrodo como información básicamente relacionada con los procesos que tienen lugar en la superficie de electrodo. Por lo tanto, y sin lugar a dudas la mayor ventaja de esta técnica es la de poder diferenciar procesos. Así, cuando los procesos son puramente difusivos los espectros registrados en ambas configuraciones proporcionan la misma información, siendo la señal obtenida en configuración paralela significativamente más intensa debido al mayor camino óptico. En cambio, cuando junto con el proceso difusivo tiene lugar otro en el que se produce, por ejemplo, la adsorción del producto de reacción sobre la superficie del electrodo, ambas señales serán claramente diferentes de tal forma que si únicamente se registrara una de las dos el mecanismo de reacción no podría explicarse en su conjunto.

Con esta nueva técnica se pueden realizar únicamente medidas de transmisión (Figura 3.4.a) utilizando un OTE como electrodo de trabajo, o realizar medidas de reflexión en configuración normal y de transmisión en configuración paralela, (Figura 3.4.b) eligiendo electrodos con una superficie reflectante.

### *3.1.1 Espectrometría de Masas de Alta Resolución (MS-HR)*

Aunque la espectrometría de masas no haya sido la principal técnica empleada en esta tesis, ésta es una técnica de análisis instrumental de alta sensibilidad con una gran utilidad a la hora de determinar la masa molecular de un compuesto mediante la medición de la relación masa-carga ( $m/z$ ), así como de los diversos fragmentos que resultan de la rotura controlada del mismo, dando información sobre la estructura de la molécula. Además, esta técnica también permite identificar tanto cualitativa como cuantitativamente, y de forma inequívoca, cualquier tipo de mezclas de sustancias.

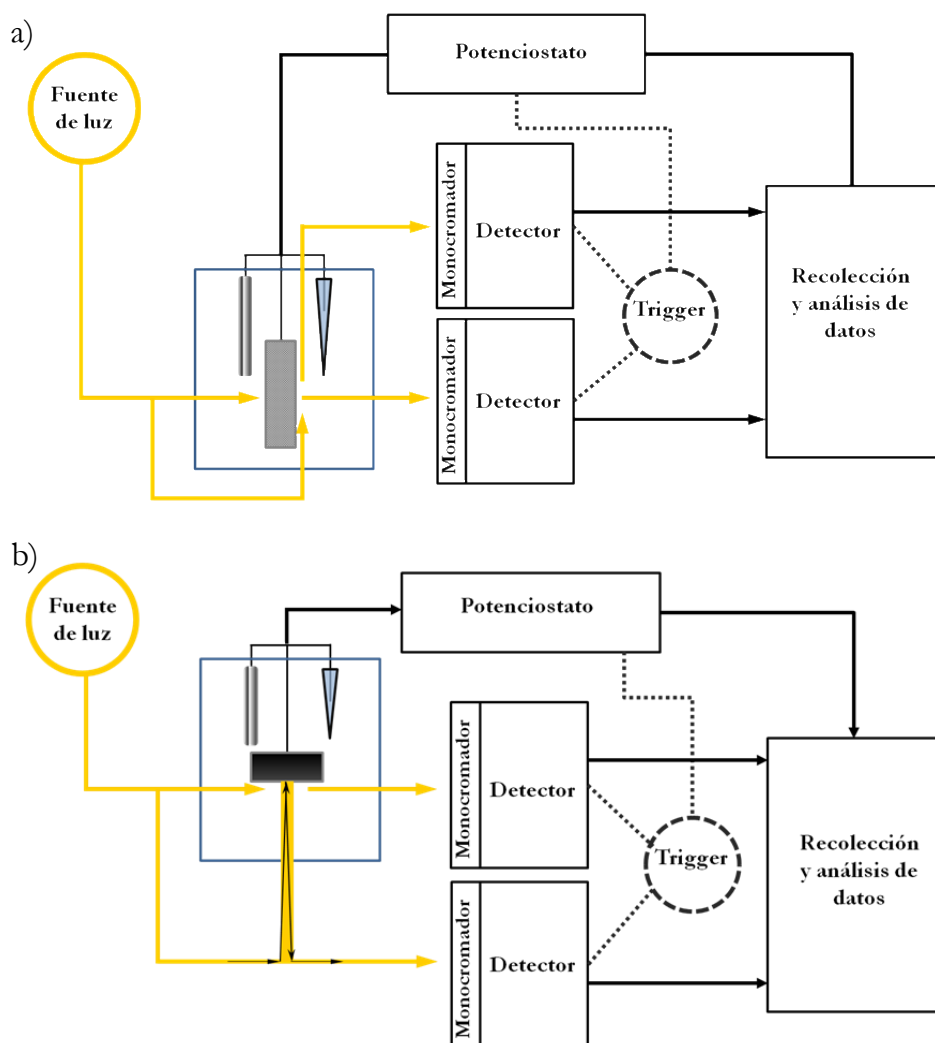


Figura 3.4 Representación esquemática del dispositivo experimental para realizar experimentos con espectroelectroquímica bidimensional realizando en configuración normal a) medidas de transmisión, y b) medidas de reflexión.

Hay que tener en cuenta que esta técnica, pese a ser llamada espectrometría de masas, no tiene relación con las técnicas espectroscópicas clásicas puesto que no se utiliza ni se mide ningún tipo de radiación electromagnética durante el análisis. Otra clara diferencia es que las técnicas espectrofotométricas, similares a las utilizadas en este trabajo, son técnicas no destructivas mientras que, la espectrometría de masas es destructiva. Una ventaja de las técnicas de masas es que la cantidad de muestra necesaria para la obtención de un espectro de masas

es muy pequeña, del orden de microgramos, mucho menor que los volúmenes habitualmente utilizados en las técnicas espectroscópicas clásicas.

La espectrometría de masas se basa en la ionización de las moléculas de la muestra, arrancando generalmente un electrón de la molécula y formando un catión-radical. Este catión-radical es el denominado ion molecular y tenderá a romperse en distintos fragmentos en función de su estabilidad, es decir, cuánto menos estable sea el ion molecular mayor será su tendencia a fragmentar hasta alcanzar los iones más estables y habrá más variedad de fragmentos. Una vez obtenidos los diferentes iones, fragmentos de la molécula inicial, estos son separados de acuerdo con su relación masa-carga para ser posteriormente detectados, proporcionando un espectro de masas en el que se representa la abundancia de los diferentes fragmentos generados, denominándose al ion más abundante pico base.

Los espectrómetros de masas suele constar de cuatro componentes:

- *Sistema de introducción de muestras:* Componente encargado que convertir la muestra en estado gaseoso e introducirla a la fuente de ionización.
- *Fuente de ionización:* Una vez introducida la muestra, ésta es ionizada y, fragmentada, ya sea por medio de bombardeo electrónico sobre la molécula, ionización química en la que el agente ionizante es un ion que va a transferir su carga a la molécula de muestra, u otros métodos.
- *Analizador de masa:* Este componente es el encargado de separar la mezcla de iones, con distintas relaciones masa-carga, producidos en la fuente de ionización. El analizador de masa suele ser un analizador magnético, Figura 3.5, el cual utiliza un imán para hacer que el haz de iones se mueva en una trayectoria circular, basándose la capacidad de discriminación de la relación masa-carga en la variación de la trayectoria de un ion en función del campo magnético de su entorno, de manera

que los iones más pesados atraviesan el sector magnético a velocidades menores

- *Detector:* Por último los iones llegan al detector, el cual registra la carga inducida o la corriente producida cuando los iones llegan a él.

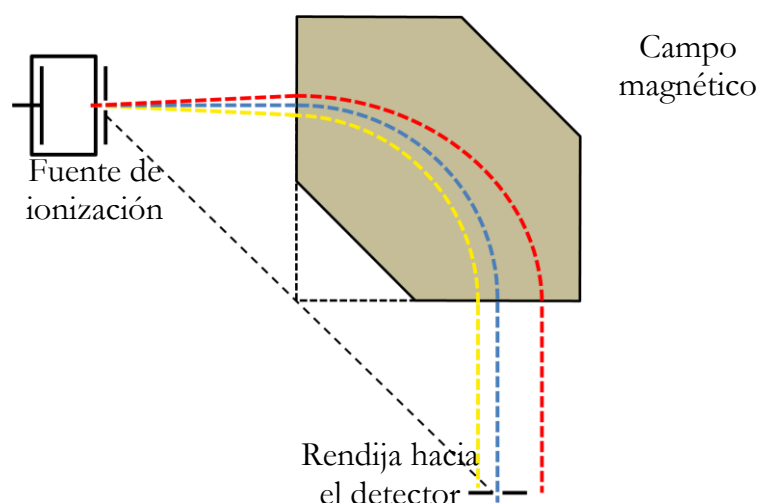


Figura 3.5 Esquema simplificado de un espectrómetro de masas de sector magnético.

### 3.2 Celdas espectroelectroquímicas de UV-Visible: El estado del arte en el siglo XXI

Aunque en la bibliografía se puede encontrar un extenso número de artículos publicados que hacen referencia a la espectroelectroquímica, en cualquiera de sus variantes espectroscópicas o electroquímicas, el porcentaje de ellos dedicado al desarrollo de dispositivos y celdas de medida es muy pequeño. En comparación al número de artículos globales en este campo, el porcentaje de artículos relacionados con el desarrollo de celdas es muy pequeño, menor del 10%, pero si además queremos centrarnos en los artículos científicos referentes al diseño y/o desarrollo de celdas espectroelectroquímicas de Ultravioleta-Visible el dato cae hasta en torno el 1 %.

Desde el año 2000 se han desarrollado diferentes celdas espectroelectroquímicas para el estudio de procesos que ocurren durante la

reacción electroquímica, de compuestos intermedios de corta duración<sup>201–203</sup> y de la química redox de moléculas orgánicas<sup>204,205</sup>, inorgánicas<sup>206–208</sup> o biológicas<sup>209,210</sup>. Como se ha comentado anteriormente, son muchas las técnicas espectroscópicas que se pueden emplear en espectroelectroquímica, y para cada una de ellas ha habido una evolución y un desarrollo de diferentes tipo de celdas y dispositivos. Durante estos últimos años, se ha continuado el camino que se comenzó el siglo XX en cuanto al diseño de nuevos dispositivos para satisfacer las necesidades impuestas por cada sistema con el fin de permitir su estudio mediante espectroelectroquímica. Así, dependiendo de las características del sistema o de la información que se deseaba obtener se han desarrollado dispositivos espectroelectroquímicos basados en técnicas espectroscópicas muy diferentes, tales como:

- ATR<sup>211–232</sup>.
- Espectroscopía Raman<sup>233–263</sup>.
- Resonancia magnética nuclear (NMR) <sup>264–268</sup>.
- Rayos X<sup>269–282</sup>.
- EPR<sup>283–288</sup>.
- Fluorescencia<sup>289–297</sup>.
- Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)<sup>298–300</sup>.
- Espectroscopía IR<sup>301,302</sup>.
- Espectroscopía UV-Visible.

Quizás la espectroelectroquímica UV-Visible puede ser considerada la más simple a la hora de realizar experimentos, si la comparamos con Raman, NMR, EPR o rayos X. Por esta razón, se la puede considerar una de las técnicas más versátiles en este campo, a la hora de obtener información sobre los procesos que ocurren en la interfase electrodo-disolución. Sin embargo, no siempre es posible determinar u obtener una información completa del analito de interés con los

dispositivos existentes, por eso es necesario diseñar y desarrollar nuevos montajes experimentales y construir celdas para este propósito. En los últimos 15 años varios grupos han desarrollado nuevas celdas en función de las necesidades exigidas por su investigación.

Para un mejor seguimiento de la evolución de las celdas desarrolladas, esta revisión se ha estructurado según la técnica espectroscópica utilizada, y dentro de cada una, una presentación cronológica. Particularmente, nos hemos centrado en dispositivos de medidas espectroelectroquímicas de absorción en el UV-Vis.

### *3.2.1 Espectroelectroquímica de absorción UV-Vis*

#### 3.2.1.1 Celdas de reflexión

Las celdas de reflexión pueden dividirse en dos clases según el modo en que se produzca la reflexión en la superficie estudiada. Así se habla de celdas, de reflexión interna y de reflexión externa. En el primer caso se suele hablar de celdas de reflexión total atenuada, en las que se estudia la interacción de la radiación en la interfase electrodo/disolución cuando pasa de una fase ópticamente más densa a una menos densa en un ángulo mayor al ángulo crítico (Figura 3.6.a). En el segundo caso, son celdas de reflexión externa o especular, en las que la radiación es reflejada por la superficie electródica altamente reflectante (similar a un espejo) pasando de un medio ópticamente menos denso a otro más denso (Figura 3.6.b).

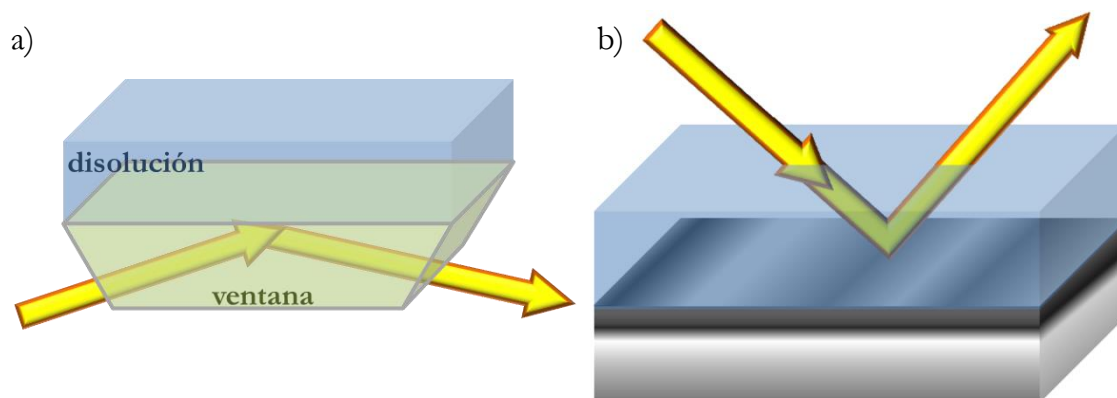


Figura 3.6 Representación esquemática del fenómeno de a) reflexión interna, y b) reflexión externa.

Todas las celdas y dispositivos de reflexión desarrolladas en este trabajo corresponden al tipo de reflexión externa o especular, por lo que la revisión de celdas se ha centrado en ese grupo.

La primera referencia desde el año 2000 de una celda para espectroelectroquímica de reflexión externa en el UV-Vis fue desarrollada por Kelber<sup>303</sup>. Para ello se utilizó una configuración de reflexión con incidencia casi normal, similar a la propuesta por Park<sup>304</sup>, utilizando una sonda de reflexión enfocada sobre la superficie del electrodo de trabajo que contenía una fibra de emisión y ocho fibras colectoras (Figura 3.7). Como electrodo de referencia (RE) se utilizó un electrodo saturado de calomelanos (SCE) y como contraelectrodo (CE) una lámina de platino unida a un hilo de platino, fijados ambos en la parte superior de una cubeta de vidrio. El electrodo de trabajo (WE) estaba embutido en una pieza de vidrio esmerilado encajada en la parte inferior de la cubeta de vidrio, evitando de esta manera su movimiento durante las medidas y controlando en todo momento su posición en la celda. Ésta se utilizó para comprender mejor la cinética de oxidación del níquel, estudiando así los procesos de corrosión de este metal a pH 5.4. De este modo se pudo obtener información que permitía diseñar sistemas capaces de inhibir o minimizar los procesos de corrosión de níquel.

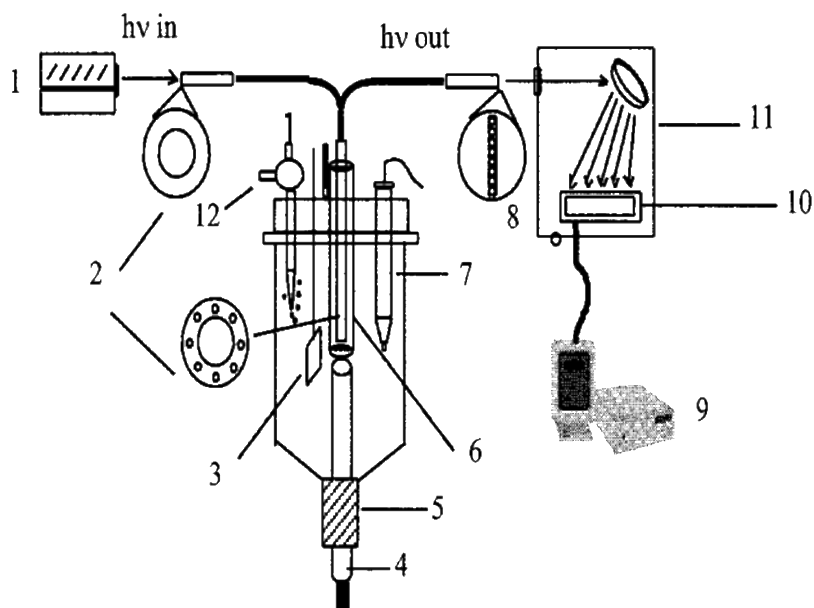


Figura 3.7 Configuración experimental usada en un dispositivo de electroquímica de reflexión especular<sup>303</sup>. 1) Fuente de luz Deuterio/halógena, 2) sonda de reflexión, 3) CE de Pt, 4) WE de Ni, 5) junta de vidrio esmerilado, 6) tubo de cuarzo, 7) RE SCE, 8) fibra óptica colectora de luz, 9) ordenador, 10) detector, 11) espectrofotómetro, 12) corriente de Argón.

Posteriormente Kubiak<sup>305</sup> desarrolló una celda electroquímica de reflexión especular de segunda generación de capa fina, Figura 3.8.a, en la que se podía controlar la temperatura para poder estudiar la electrogeneración de especies que son térmicamente inestables a temperatura ambiente. La temperatura podía ser controlada en un rango desde  $-55^{\circ}\text{C}$  a  $80^{\circ}\text{C}$  mediante un flujo recirculado termostatzado por el cual circulaba aceite de silicona. La geometría y disposición de los electrodos se muestra en la Figura 3.8.c. El electrodo de trabajo es una lámina de Pt de 4.5 mm de diámetro soldado a una barra de latón. El electrodo de referencia era un hilo circular de Ag de 0.5 mm de grosor situado a 0.5 mm alrededor del perímetro del WE, el contraelectrodo un hilo de Pt de 0.5 mm de grosor situado de forma concéntrica alrededor del electrodo de referencia. Los puertos de inyección Luer se ajustaron por presión en el cuerpo de aluminio. A través de ellos se podía llenar la celda sin exponer las disoluciones al aire. Se realizaron separadores de teflón de diferentes grosores y



longitudes para poder montar la celda con diferentes caminos ópticos desde 50  $\mu\text{m}$  a más de 3 mm. La celda se validó con una disolución de ferrocianuro potásico en medio acuoso y con ferroceno en acetonitrilo. Una vez validada se procedió al estudio del anión radical del complejo organometálico,  $\text{Fe}(\text{CO})_3(\eta^4\text{-}2,5\text{-norborenadieno})$  en tetrahidrofurano. Se observó que el compuesto exhibía un comportamiento inestable hasta los  $-10^\circ\text{C}$ , consiguiéndose registrar su espectro a  $-15^\circ\text{C}$  con esta nueva celda espectroelectroquímica.

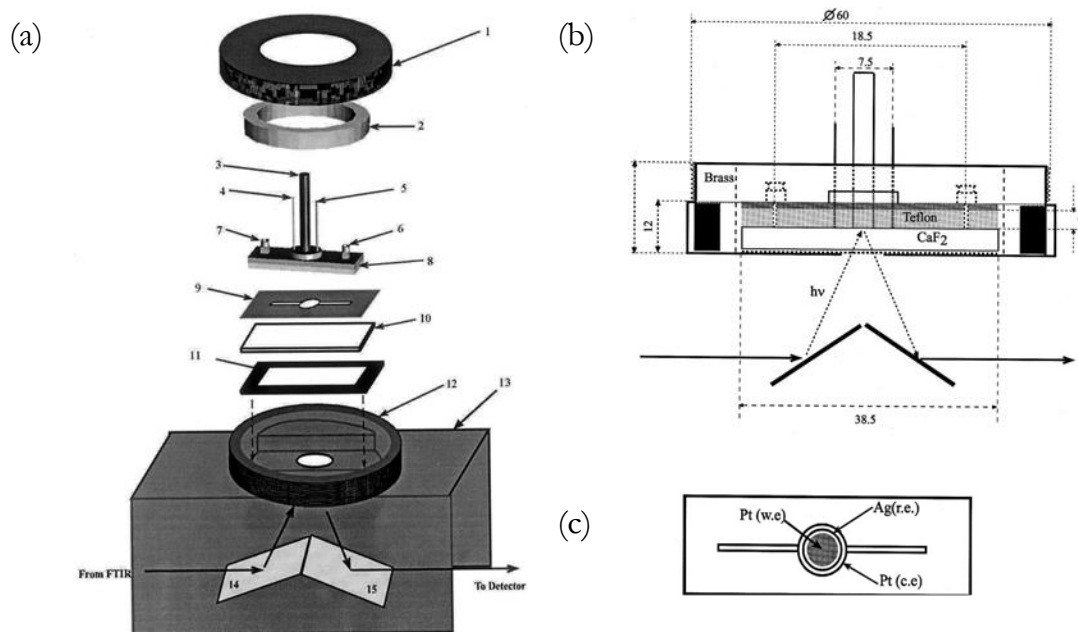


Figura 3.8 (a) Esquema de las partes de la celda espectroelectroquímica<sup>305</sup>. 1) tapa metálica con rosca, 2) anillo de teflón, 3) lámina de Pt como electrodo de trabajo, 4) hilo de Pt como electrodo auxiliar, 5) hilo de Ag como pseudo-referencia 6) y 7) puertos de inyección, 8) cuerpo de la celda, la parte superior construida en aluminio y la inferior en teflón 9) espaciadores de teflón para delimitar el camino óptico, 10) ventana de  $\text{CaF}_2$  ( $38.5 \times 19.5 \times 4$  mm), 11) junta de goma, 12) hueco del cuerpo de la celda, 13) accesorios de los espejos de reflexión, 14) y 15) espejos. (b) Corte vertical de la celda. (c) Disposición de los electrodos.

En 2001 De Backer<sup>299</sup> diseñó un dispositivo de medida útil para realizar medidas espectroelectroquímicas con distintas técnicas espectroscópicas, como FTIR, UV-Visible, IR, Raman o fluorescencia<sup>306</sup>, variando ligeramente el diseño de la celda (Figura 3.9). La celda fue construida en teflón y se utilizaba juntas

tóricas para asegurar el hermetismo de la misma. El electrodo de trabajo se acopló a una varilla de teflón. Ésta se unió a un tornillo micrométrico que permitía el ajuste fino de la distancia entre el electrodo de trabajo y la ventana óptica, permitiendo por un lado, poder regular la longitud del camino óptico, y, por el otro, poder trabajar en condiciones tanto de capa fina como en régimen de difusión semi-infinita. Este dispositivo ha sido utilizado para el estudio de diferentes compuestos y procesos en sucesivos trabajos. En este primer artículo<sup>299</sup> se puso a prueba la celda mediante el estudio de la reducción de una quinona, tetracianoquinodimetano (TCNQ), sistema bastante conocido y estudiado con anterioridad. Los estudios fueron realizados con un electrodo de trabajo de oro para las experiencias de infrarrojo, y con electrodo de platino para las experiencias UV-Visible obteniéndose información estructural y sobre del mecanismo de reacción.

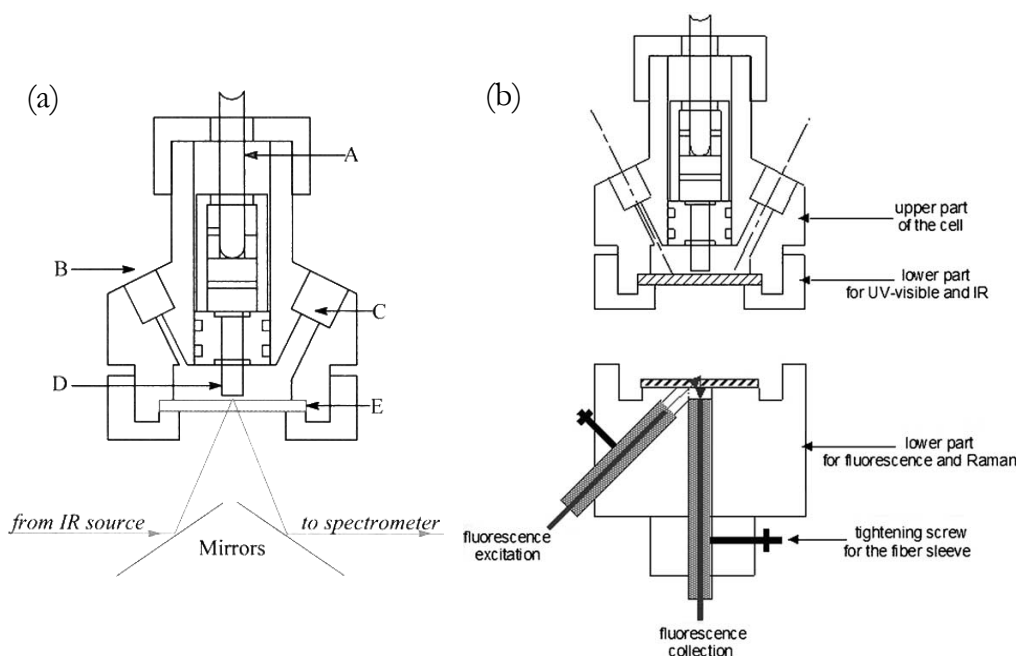


Figura 3.9 Esquema de la celda espectroelectroquímica<sup>299</sup> para realizar medidas en IR, UV-Visible, Raman o fluorescencia. (a) Disposición para medidas de absorción IR y UV-Visible. A) Micrómetro, B) contraelectrodo, C) electrodo de referencia, D) electrodo de trabajo, E) ventana óptica y (b) Disposición para medidas de fluorescencia.

Esta celda en su versión para realizar medidas espectroelectroquímicas de fluorescencia (Figura 3.9.b) se utilizó para el estudio de la reducción de derivados solubles de perileno<sup>306</sup> obteniéndose importante información estructural sobre ese sistema. Este dispositivo se utilizó para estudiar la oxidación y regeneración de polisulfuros bajo condiciones anódicas con espectroelectroquímica de UV-Visible.<sup>307</sup> En este trabajo se utilizó como electrodo de trabajo uno de GaAs, realizándose el estudio en capa fina para asegurar la electrolisis total de una disolución de sulfuro de amonio y ver la interacción de los sulfuros generados con el electrodo. Se pudo observar como en la interfase electrodo-disolución los polisulfuros son oxidados bajo polarización anódica, y, posteriormente regenerados en la interfase bajo la presencia de iones hidrosulfuro. También se comprobó que el electrodo de GaAs no se pasivaba por una capa de azufre, como ocurría utilizando electrodos de oro o platino.

En el 2002 Best<sup>308</sup> desarrolló una celda espectroelectroquímica para el estudio de la interacción de especies activas con sustratos gaseosos a presiones superiores a 1 MPa permitiendo el estudio de sistemas con elevada presión de vapor (Figura 3.10).

La celda posee una configuración compacta lo que permite trabajar con pequeños volúmenes de disolución, de apenas unos 50  $\mu\text{l}$ . Esta celda fue diseñada para facilitar el estudio de muestras sensibles al aire, especialmente en aquellas en las que el volumen de muestra es un factor limitante, como suele ser el caso de muestras biológicas. El diseño de la celda fue optimizado de forma que se pudiera trabajar en diferentes rangos de temperatura y presión, así como en atmósfera inerte. Se eligió la disposición de reflexión externa para poder trabajar con mayor comodidad a altas presiones de la fase gaseosa, y para reducir los tiempos necesarios para la electrosíntesis. El cuerpo de la celda ha sido construido en acero inoxidable para poder soportar altas presiones, mientras que los electrodos fueron embutidos en una pieza de policlorotrifluoroetileno (Kelf), para fijar sus posiciones.

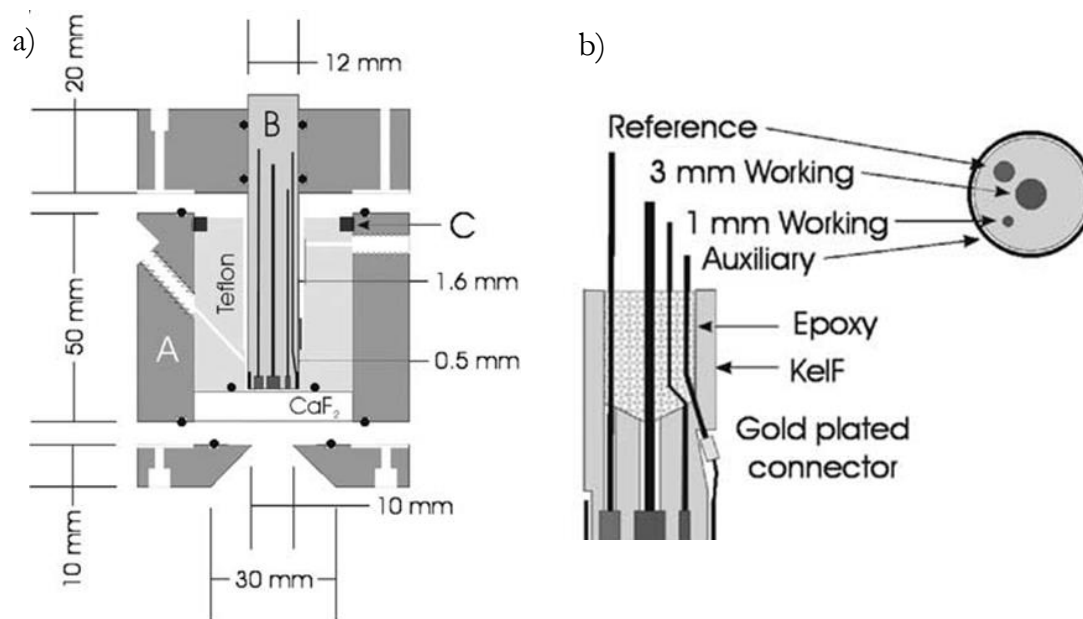


Figura 3.10. (a) Esquema de la celda espectroelectroquímica de alta presión<sup>308</sup>. (A), cuerpo del dispositivo de acero inoxidable (B) sistema de 3 electrodos en KClF<sub>2</sub> y (C) micrómetro para controlar la longitud del camino óptico. (b) Vista ampliada de la disposición de los electrodos.

El electrodo de trabajo fue un disco pulido de 3 mm de diámetro de platino, oro o carbono vítreo, dependiendo el material de las necesidades del sistema. Se utilizó un hilo de plata de 2 mm de diámetro como pseudo-referencia, y un anillo de Pt como contraelectrodo. Adicionalmente, se añadió otro electrodo de trabajo de un diámetro menor (1 mm) para poder estudiar las propiedades electroquímicas de la disolución independientemente de las medidas realizadas con el experimento espectroelectroquímico. Entre el cuerpo de la celda y el bloque de los electrodos se añadieron cuerpos de teflón para disminuir el volumen de la muestra en el interior de la celda. En la parte inferior se colocó una ventana de CaF<sub>2</sub> de 7 mm de grosor por la que pasará el haz de radiación. Para sellar la celda se utilizó una junta tórica de 35 mm de diámetro que mantenía unida la ventana y los bloques de teflón. Se utilizaron válvulas Swagelok para suministrar el gas, controlar su presión y prevenir el exceso de presión en la celda durante los experimentos. El camino óptico se puede variar gracias a un micrómetro que puede ajustar la distancia entre el bloque de los electrodos y la

ventana. La celda se utilizó para el estudio de la coordinación reversible de CO con complejos de níquel-ditioleno. Se pudo observar la formación de aductos del complejo con grupos carbonilo, que pueden ser reoxidados para obtener nuevamente el complejo de partida.

En 2004 Scherson publicó un artículo en el que utilizaba una celda espectroelectroquímica en capa fina provista de un electrodo rotatorio<sup>309</sup> con el cual realizó un estudio sobre la capa límite de difusión del ferrocianuro. En este estudio se demostró que si se consigue, que la capa límite de difusión esté bien definida utilizando un electrodo rotatorio, se podría simular el comportamiento de las celdas espectroelectroquímicas ópticamente transparentes de capa fina (OTTLIC) con la ventaja de poder reducir la caída óhmica que poseen este tipo de celdas. El montaje del dispositivo se realizó como se muestra en la Figura 3.11.

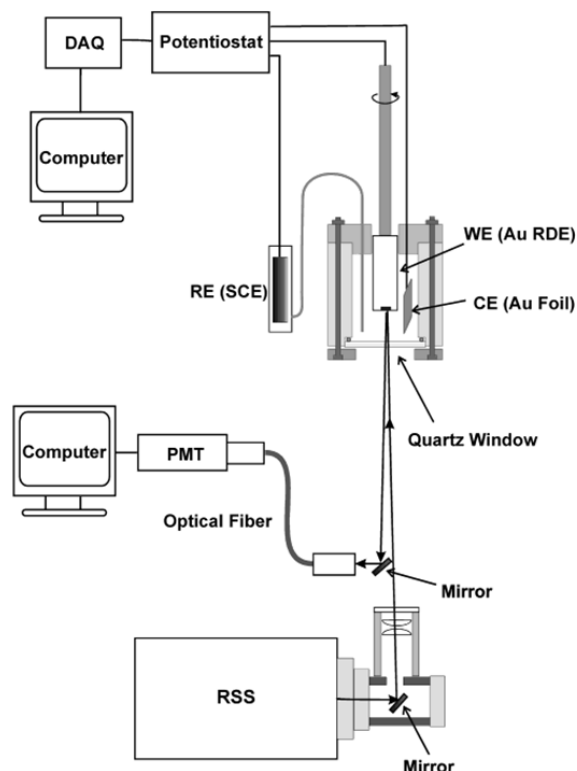


Figura 3.11 Esquema de la celda espectroelectroquímica de electrodo rotatorio para el estudio de la capa límite de difusión<sup>309</sup>.

Para ello se utilizó un montaje de tres electrodos convencional, donde el electrodo de trabajo fue un electrodo rotatorio comercial de oro, el de referencia,

uno de calomelanos saturado y el auxiliar una lámina de oro. Estos electrodos se montaron sobre una ventana de cuarzo sobre la que se incidía el haz de radiación.

Posteriormente, en 2006, Bernard presentó una celda para hacer un estudio espectroelectroquímico de proteínas utilizando espectroscopía de reflexión ultravioleta, visible e infrarrojo<sup>310</sup>. Como la celda fue desarrollada para el estudio de proteínas, en el diseño se intentó que la longitud de camino óptico fuera de unos pocos micrómetros, para utilizar solo unos pocos mililitros de muestra, y reducir, así, el proceso de preparación de la misma. El diseño de la celda espectroelectroquímica se muestra en la Figura 3.12. El cuerpo de la celda se realizó en poliéterétercetona (PEEK) debido a su alta resistencia química. El contraelectrodo de oro (C) se construyó en dos mitades rodeando al electrodo de trabajo. El electrodo de referencia de Ag/AgCl/3M KCl (R) se insertó en un lado de la celda, cerca del electrodo de trabajo. El contacto eléctrico se garantizó gracias a una disolución tampón añadida sobre el contraelectrodo. La muestra y la disolución tampón estaban separadas por un anillo poroso de teflón de 0.5 mm de espesor previamente empapado en la disolución tampón. Este anillo poroso garantizaba la separación de las reacciones que ocurren en el electrodo de trabajo de las que ocurren en el contraelectrodo, evitando de este modo la contaminación por adsorción y desnaturalización de las proteínas sobre el contraelectrodo. Con esta celda, se conseguía que se formara una película de disolución de la muestra problema entre el electrodo de trabajo de oro (W), situado en la parte central de la celda, y la ventana, que puede ser de CaF<sub>2</sub>, cuarzo, ZnSe o Ge dependiendo de la región espectral que se quiera estudiar. El espesor de esta película, es decir, la longitud del camino óptico, era de unos 10 μm. Finalmente, la ventana de la celda se montaba, y se fijaba progresivamente todo el sistema hasta que la gota cubría completamente el diámetro de 10 mm del electrodo de trabajo y, éste entraba en el anillo de teflón poroso. La difusión de la muestra a través del anillo poroso de teflón era lo suficientemente lenta como para evitar que entrara en contacto con la disolución tampón que está sobre el electrodo auxiliar.

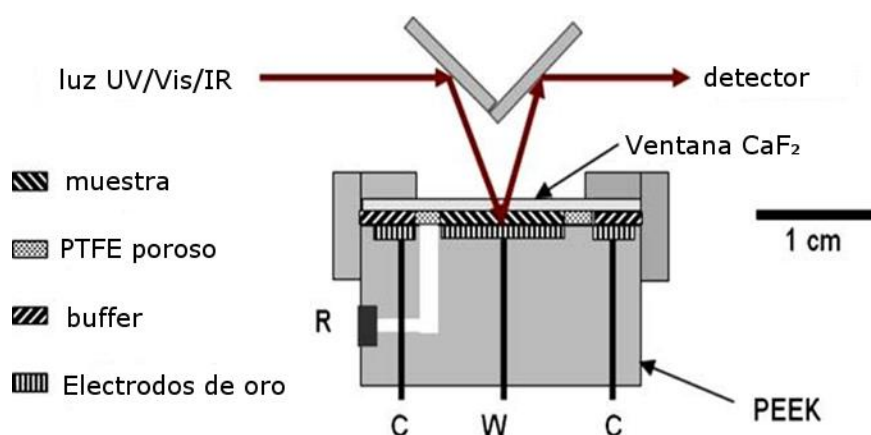


Figura 3.12 Celda espectroelectroquímica para el estudio de proteínas<sup>310</sup>.

El haz de luz incidente era dirigido mediante fibras ópticas hacia un espejo que hacía que el haz incidiera con un ángulo de  $45^\circ$  de inclinación sobre la muestra. La luz reflejada por el electrodo de trabajo se hacía llegar de manera similar al detector. Después de añadir la muestra y de realizar el ajuste de la trayectoria de las fibras ópticas, se inyectaba la disolución tampón y el electrolito soporte para formar un puente conductor entre el electrodo de trabajo, el contraelectrodo, y el electrodo de referencia. Por último, se insertaba el electrodo de referencia y se conectaba el sistema al potenciostato.

En 2006 el grupo de investigación de López-Palacios desarrolló una celda espectroelectroquímica de flujo para el estudio de películas poliméricas electrogeneradas sobre el electrodo de trabajo<sup>311</sup>. La celda (Figura 3.13) constaba de un cuerpo cilíndrico de teflón de 22 mm de diámetro y 15 mm de altura. La sonda de reflexión, compuesta por 6 fibras de iluminación colocadas alrededor de una fibra de recolección, se insertaba en un agujero perforado en una de las caras del cuerpo cilíndrico de la celda. En la otra cara de la celda se perforó otro agujero y se insertó el electrodo de trabajo de oro. Con esta geometría la luz incidía perpendicularmente a la superficie del electrodo de trabajo, y la luz reflejada también se recogía perpendicularmente a dicha superficie, muestreándose aproximadamente un área de  $1 \text{ mm}^2$ . La entrada y salida de disolución se realizaba a través de unos tubos colocados en la pared de la celda

perpendicularmente a la sonda de reflexión y al electrodo. El volumen eficaz de la celda se puede modificar para cada experimento mediante la variación de la distancia entre la sonda de reflexión y el electrodo de trabajo. El contraelectrodo, un hilo de platino, y el electrodo de referencia, un microreferencia de Ag/AgCl, fueron colocados en los canales de salida y entrada de flujo, respectivamente. El sistema de flujo fue controlado por una bomba peristáltica.

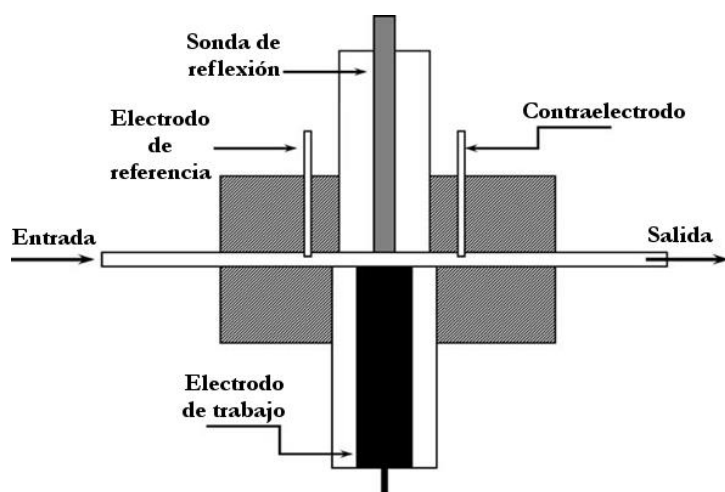


Figura 3.13 Representación esquemática de la celda de flujo<sup>311</sup>.

Esta celda se utilizó para estudiar la electropolimerización a potencial controlado de polianilina y su sobreoxidación una vez formada una película sobre electrodo de trabajo. Se estudió, además, la influencia de la velocidad de flujo durante el proceso de electropolimerización. El control de este parámetro permitió reducir tanto la degradación del polímero como la generación de los productos de reacciones secundarias.

En el año 2011 Heineman<sup>312</sup> desarrolló una celda para realizar experimentos en difusión semi-infinita en microgota (30 $\mu$ l). Para ello fabricó una celda compuesta por dos láminas de aluminio en las que se realizaron orificios en el centro de ambas láminas para alojar la sonda de reflexión y los electrodos. La sonda de reflexión se colocó en la lámina, mientras que los electrodos se situaron en la superior. Las dos láminas metálicas estaban separadas por una junta tórica y



una ventana de cuarzo que permitía el paso del haz de luz. Las dos láminas se sujetaron con tornillos para mantener la estabilidad de la celda, así como para proporcionar un soporte estable para los electrodos de referencia y auxiliar, que además fueron fijados con resina epoxi. El electrodo de trabajo se situaba, aproximadamente, a 1 mm de la ventana de cuarzo. Posteriormente se colocaba una microgota de disolución entre el electrodo y la ventana de cuarzo, asegurándose que entraba en contacto con el contraelectrodo y el electrodo de referencia, manteniéndose estable gracias a la tensión superficial entre el electrodo y la ventana de cuarzo (Figura 3.14).

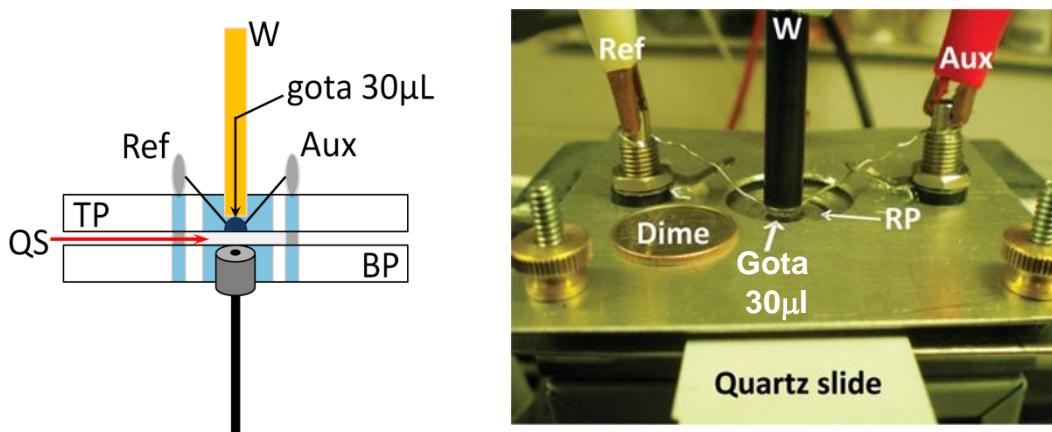


Figura 3.14 a) Representación esquemática de la celda, b) Fotografía de la celda real<sup>312</sup>.

Esta celda se validó con una disolución de ferricianuro potásico con la que además se verificó la distancia real entre el electrodo de trabajo y la ventana de cuarzo, siendo ésta la mitad de la longitud del camino óptico. Se comprobó el buen funcionamiento de la celda, proponiéndose como una buena alternativa para estudiar micromuestras debido a la poca cantidad de disolución que requiere.

Flowers en 2013 desarrolló otra celda espectroelectroquímica en capa fina para analizar volúmenes de muestra de submicrolitros<sup>313</sup> (Figura 3.15). La celda utilizaba una sonda de reflexión para realizar las medidas espectroscópicas, colocada perpendicularmente a la superficie del electrodo de trabajo. La celda constaba de varias capas. La sonda de reflexión se colocaba en la parte inferior de

la celda en contacto con una ventana de cuarzo. Sobre esta pieza se colocaba una capa de celulosa con un orificio central para dejar paso al haz de luz. A continuación se ponía una membrana de nafión, previamente empapada en  $\text{KNO}_3$ , que servía de puente salino entre los electrodos. Por último se añadía una capa de cera de parafina para fijar todo el sistema, y mantener el nafión hidratado. La capa de parafina se diseñó con un orificio para cada uno de los tres electrodos. La disolución problema se añadía a través del orificio para el electrodo de trabajo.

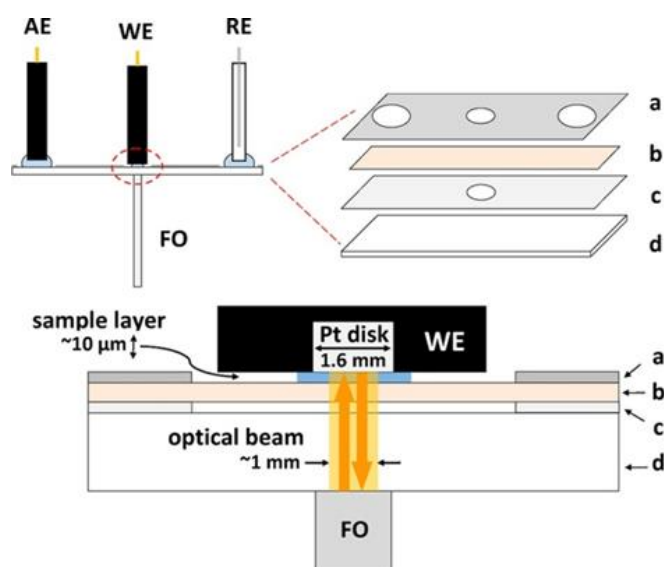


Figura 3.15 Celda espectroelectroquímica de capa fina. a) Capa de parafina, b) capa de nafión, c) pieza de celulosa, y d) ventana de cuarzo<sup>313</sup>.

La celda se evaluó con el par ferrocianuro/ferricianuro obteniendo resultados decentes, teniendo en cuenta el corto camino óptico de la celda.

### 3.2.1.2 Celdas de transmisión

Las celdas de transmisión se basan en hacer pasar el haz de luz a través de la disolución ya sea en configuración normal al electrodo, utilizando un electrodo ópticamente transparente y recogiendo la luz transmitida a través de él (Figura 3.1.a), o en configuración paralela, donde la radiación atraviesa la disolución en una dirección paralela a la superficie del electrodo de trabajo (Figura 3.1.b).

### 3.2.1.2.1 Configuración normal

En esta configuración se utilizan electrodos ópticamente transparentes (OTEs), como, por ejemplo, rejillas metálicas o películas finas de materiales conductores como el óxido de indio estaño (ITO) o el oro. El haz de radiación electromagnética puede pasar a través de estos electrodos, recogiendo información sobre los procesos que tienen lugar tanto en el electrodo como en la disolución adyacente al mismo. La ley de Lambert-Beer se puede utilizar suponiendo que la zona que atraviesa el haz de luz está constituida por un cierto número de capas infinitesimales ( $n$ ), cada una de ellas considerada como una disolución homogénea (Figura 3.2). Las señales absorciométricas en configuración normal contienen únicamente información relacionada con los procesos faradaicos, siendo su forma similar a la de la carga eléctrica puesta en juego. La principal diferencia entre ambas señales se debe a los procesos no faradaicos, que se suman a la señal electroquímica y no son visibles en la espectroscópica.

En 2003 Haymond<sup>314</sup> fabricó una celda espectroelectroquímica de capa fina para validar unos electrodos nuevos de diamante dopado con boro sin soporte sólido (Figura 3.16). Para ello diseñaron una celda específicamente para las medidas realizadas con este electrodo. El dispositivo se desarrolló con la idea de ser utilizado en el interior de una cubeta de cuarzo comercial de 1 cm<sup>2</sup> de base. El montaje de la celda se realizó colocando un separador de mica de unos 100  $\mu\text{m}$  de espesor para separar el electrodo de la pared de la celda de cuarzo, que tenía la función de ventana, consiguiéndose así una celda de capa fina. A continuación se introducía una pieza de Kel-F (policlorotrifluoroetileno), en la que se colocaba una junta tórica en la cara en contacto con el electrodo, mientras que en la capa opuesta se insertaban unos pequeños muelles. De este modo se conseguía que la pieza empujara al electrodo para que el electrodo de trabajo se mantuviera en contacto con el separador y no se produjeran variaciones en el grosor de la capa fina. Además, se realizaron pequeños orificios en la pieza de Kel-F para colocar el

contacto eléctrico del electrodo de trabajo y los electrodos de referencia y auxiliar, los cuales están comunicados con la capa fina mediante un pequeño canal ubicado en la parte superior del cuerpo de la celda.

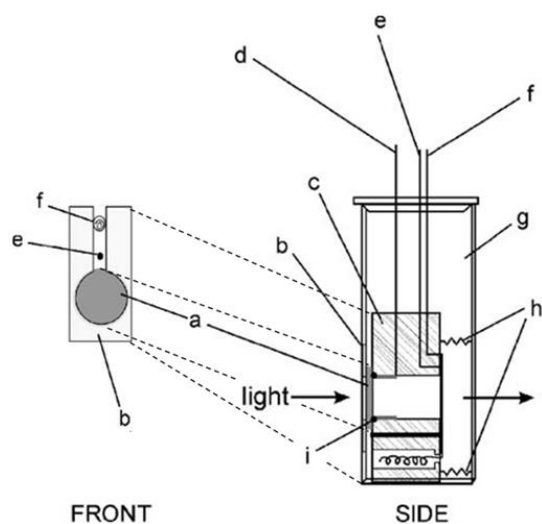


Figura 3.16 Representación esquemática de la celda de capa fina de Haimond<sup>314</sup>: a) electrodo de trabajo ópticamente transparente de diamante dopado con boro, b) espaciador de mica, c) pieza de Kel-F, d) contacto eléctrico del electrodo de trabajo, e) electrodo de referencia, f) electrodo auxiliar, g) cubeta de cuarzo comercial, h) muelles, i) junta tórica.

La celda se validó con el par ferroceno/ferricinio, un sistema ampliamente conocido dando resultados concordantes a la literatura demostrando la utilidad tanto de la celda de capa fina como del electrodo de diamante dopado con boro.

El mismo año, Schwarz<sup>315</sup> desarrolló una celda para el estudio de 4-aminofenol tanto en fase acuosa como en fases orgánicas, como ejemplo para el posterior estudio de contaminantes ambientales oxidables (Figura 3.17). La celda fue diseñada acorde a las necesidades requeridas por estos sistemas. Para ello se construyó una celda hermética utilizando una junta tórica, aunque podían existir pequeños canales de entrada de aire en el interior a través de la junta debido al material del que estaba fabricado, NBR (goma de nitrilo-butadieno). La disolución se situó dentro de una celda circular formando una capa fina entre dos ventanas de cuarzo situadas en sendos marco de resina epoxi, con los cuales se

puede regular el espesor de la capa fina formada en el interior de la celda. El electrodo de trabajo, una lámina de oro con perforaciones para formar una malla, se encuentra en el interior de la celda. En la parte inferior se ubica el electrodo de referencia, y a ambos lados del electrodo de trabajo se sitúan dos láminas de platino de forma simétrica a modo de contraelectrodo. Para facilitar el llenado de la celda, la entrada de disolución se encuentra en la parte inferior de la misma, y la salida en la parte superior, permitiendo el uso de esta celda tanto para mediadas en régimen estacionario como en flujo.

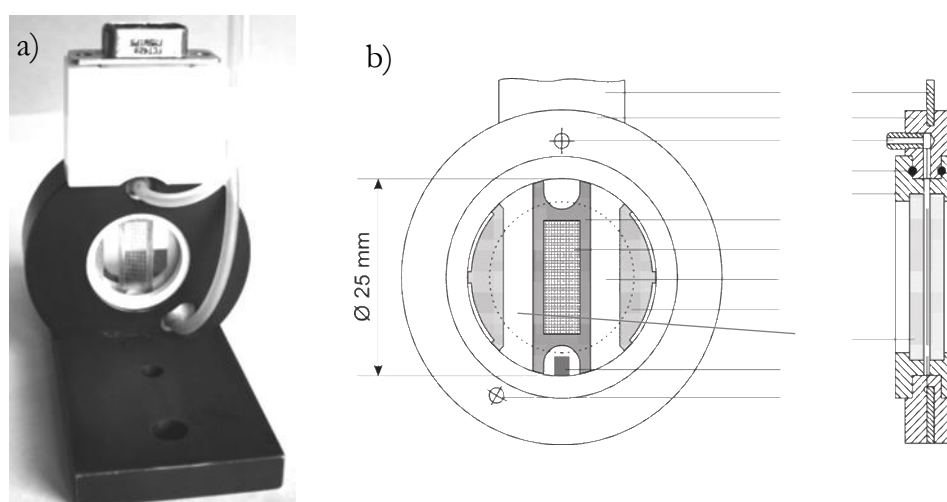


Figura 3.17 a) Montaje de la celda espectroelectroquímica de capa fina en configuración normal en transmisión<sup>315</sup>, b) Representación esquemática de la celda. PCI: Placa de circuito impreso, SE: soporte del electrodo, SD: salida de la disolución, JT: junta tórica, ERE: marco de resina epoxi, WE: electrodo de trabajo, PWE: perforación de la malla del electrodo de trabajo, EC: espacio interior de la celda, CE: contraelectrodos, VQ: ventana de cuarzo, RE: electrodo de referencia, ED: entrada de disolución<sup>315</sup>.

Un año más tarde en 2004, López-Palacios<sup>190</sup> diseñó una celda espectroelectroquímica de difusión semiinfinita de transmisión en configuración normal (Figura 3.18). El dispositivo fue desarrollado con la idea de poder ser utilizado en cubetas espectroscópicas comerciales de 10 x 10 mm. La celda estaba compuesta por una pieza de teflón situada en la parte inferior de la cubeta con una ranura para la colocación del electrodo de trabajo el cual, es un OTE de

película fina de oro formada por *sputtering* sobre una lámina de cuarzo. Entre el electrodo de trabajo y la pared de la cubeta de cuarzo por la que pasa el haz incidente se colocó otra pieza de teflón con una ranura de 0.5 mm, para limitar la cantidad de luz que llega al electrodo. El contraelectrodo se colocó entre esta pieza y el electrodo de trabajo. Finalmente, el electrodo de referencia se ubicó al otro lado del electrodo de trabajo, en un lateral para evitar que interfiera físicamente en el camino óptico. En la parte superior de la celda se añadió una tapa de teflón con diferentes orificios para ayudar a la sujeción de los electrodos y para minimizar el contacto con el aire. Por último un orificio más fue realizado en la tapa para facilitar la desoxigenación de la muestra. Esta celda se utilizó para el estudio y el seguimiento de la electrosíntesis de polímeros conductores.

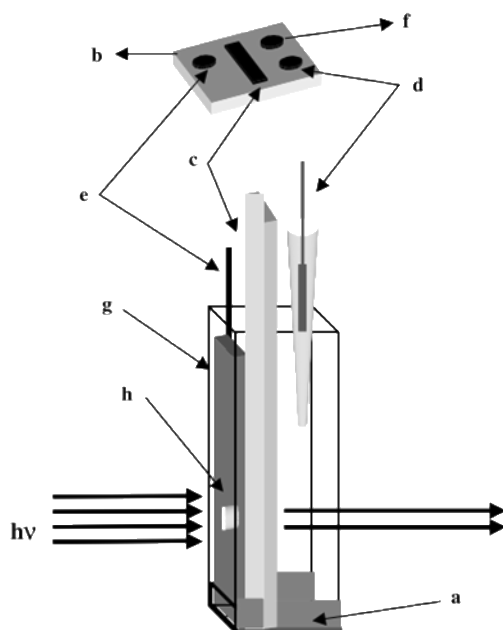


Figura 3.18 Representación esquemática de la celda electroquímica de difusión semi-infinita<sup>190</sup>: a) pieza de teflón con una ranura para fijar el electrodo de trabajo, b) tapa de teflón, c) electrodo de trabajo, d) electrodo de referencia, e) contraelectrodo, f) orificio para desoxigenar la disolución, g) máscara de teflón con h) un orificio de 0.5 mm para que pase el haz de luz.

En 2007 Stojek<sup>316</sup> desarrolló una celda electroquímica para realizar el seguimiento de la electrooxidación de la doble hélice de ADN mediante

voltamperometría cíclica. Al igual que muchos de los dispositivos que se están nombrando, esta celda fue diseñada para su alojamiento en cubetas de cuarzo comerciales (Figura 3.19). La celda consistía en una pieza de teflón con dos compartimentos separados en el centro por una pared con un orificio para que pase el haz de luz. Los electrodos se encuentran embebidos en la pieza de teflón estando el electrodo de trabajo (W), malla de platino, a un lado y el electrodo de referencia (R) y contraelectrodo (C) al otro. La celda fue diseñada de este modo para mantener en una posición fija los electrodos y facilitar los procesos de limpieza necesarios para trabajar con estos sistemas.

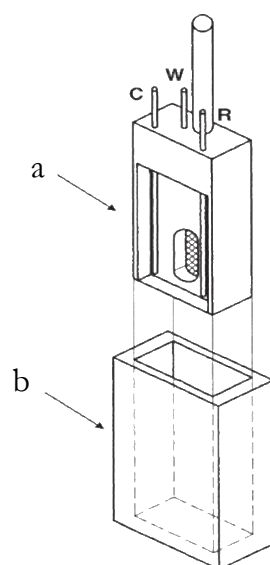


Figura 3.19 Celda electroquímica<sup>316</sup>. a) Soporte de teflón de la celda, b) cubeta de cuarzo.

En 2010, Dunsch y colaboradores desarrollaron una celda para realizar estudios electroquímicos mediante ESR y UV-Vis simultáneamente, pudiendo trabajar tanto en régimen de difusión semi-infinita como en capa fina<sup>317</sup> (Figura 3.20). La celda se desarrolló para el estudio de procesos de varias etapas en sistemas redox orgánicos, ya que cada una de las técnicas espectroscópicas empleadas proporciona información complementaria de las reacciones de comparación que pueden darse en estos sistemas. De esta forma, se podía obtener una mejor comprensión de estos mecanismos, puesto que ESR

proporciona información estructural detallada de las especies paramagnéticas y el espectro UV-Vis contiene información tanto de las especies diamagnéticas y paramagnéticas formadas en reacciones redox complejas. La celda fue diseñada para realizar medidas ESR, por lo que se utilizó una cubeta de cuarzo plana para ESR. En ella, se introdujo el electrodo de trabajo laminado con una malla de oro, a su lado un hilo de plata como pseudoelectrodo de referencia y, por la parte inferior, se introdujo un hilo de platino como contraelectrodo. En la celda de capa fina además se introdujo una lámina de material inerte y ópticamente transparente para reducir el volumen necesario de muestra.

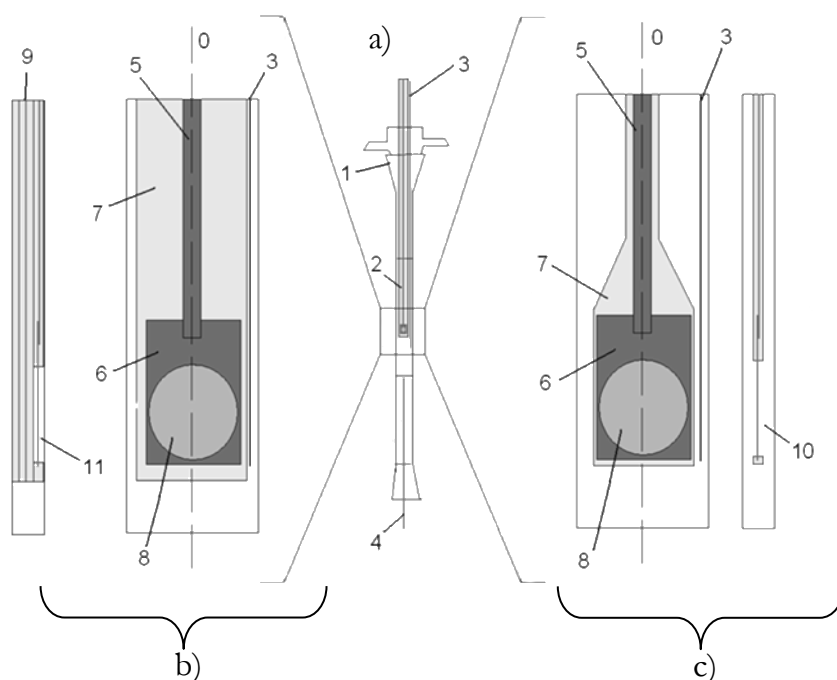


Figura 3.20 a) Esquema de la celda espectroelectroquímica, b) Ampliación de la parte central de la celda de capa fina en vista de frontal y de perfil, c) Ampliación de la zona central de la celda adaptada para capa estándar en vista frontal y de perfil. 1) Cubeta plana de cuarzo de ESR, 2) electrodo de trabajo plano, 3) electrodo de referencia, 4) contraelectrodo, 5) lámina de oro, 6) micromalla de oro, 7) lámina para soporte del electrodo de trabajo, 8) superficie electroactiva no laminada, 9) lámina de material inerte y ópticamente transparente, 10) cavidad para la disolución de la celda espectroelectroquímica cuando trabaja en régimen de difusión semi-infinita, 11) cavidad para la disolución de la celda espectroelectroquímica en capa fina<sup>317</sup>.



En 2013, el grupo de Mozo<sup>318</sup> desarrolló una celda espectroelectroquímica de flujo (Figura 3.21). La celda se diseñó con las mismas dimensiones exteriores de una cubeta comercial espectroscópica, de forma que pueda ser utilizada en espectrofotómetros comerciales.

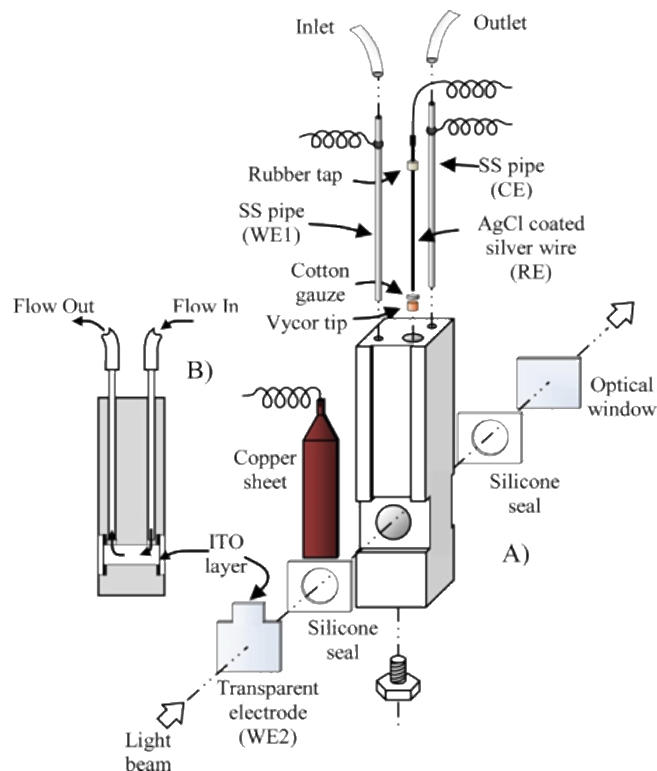


Figura 3.21 Representación de la celda espectroelectroquímica de flujo<sup>318</sup>.

Estaba compuesta por un cuerpo polimérico químicamente inerte. En la parte inferior se realizó un orificio de 6 mm de diámetro como canal para la disolución y para el paso del haz de luz. En una de las caras del orificio se situó una ventana de cuarzo y en la otra un ITO para que funcione como electrodo de trabajo. Ambas piezas fueron fijadas al cuerpo de la celda con silicona. En el cuerpo de la celda se realizaron longitudinalmente tres orificios más pequeños, uno para el electrodo de referencia y los otros dos, más próximos a los laterales en los que se ubicaron sendos catéteres de acero inoxidable con la doble función de permitir la entrada y salida de la disolución y de actuar como electrodos de trabajo y auxiliar,

respectivamente. De esta manera la celda tenía la posibilidad de utilizar dos electrodos de trabajo diferentes, el catéter de entrada de disolución o el ITO situado como ventana por la que la luz incide en la celda. La celda se validó electroquímicamente con los dos tipos de electrodos de trabajo, aunque espectroelectroquímicamente solo con el electrodo de trabajo de ITO, puesto que cuando se trabaja con el electrodo de acero inoxidable el dispositivo trabaja en tándem, ya que las medidas espectroscópicas se toman tras la aplicación de potencial.

#### 3.2.1.2.2 Configuración en paralelo

En esta configuración se utilizan las denominadas celdas de largo camino óptico, en las cuales la radiación electromagnética atraviesa la disolución en una dirección paralela a la superficie del electrodo, suministrando información únicamente sobre los procesos que tienen lugar en la disolución adyacente al mismo. Este tipo de configuración puede emplearse tanto en celdas de capa fina como de difusión semi-infinita, siendo denominadas, en general, como de largo camino óptico. Sin embargo, existen algunas desventajas para la realización de medidas en este tipo de configuración. La fabricación y el diseño de las celdas suele ser complicado, lo que muchas veces se traduce en un tamaño inadecuado para su uso directo en espectrofotómetros convencionales. También pueden existir dificultades en la limpieza de los electrodos y de la celda. Sin embargo la mayor sensibilidad de las medias ópticas debido al largo camino óptico, la posibilidad de utilizar electrodos de trabajo con un gran área en comparación al volumen de disolución empleada pudiendo provocar la electrolisis total del sistema en un corto periodo de tiempo, y la posibilidad de utilizar electrodos de trabajo que no sean ópticamente transparentes, convierten a la espectroelectroquímica en configuración paralela en una técnica a tener en cuenta para el estudio de determinados sistemas.

La primera celda publicada desde el año 2000 en relación a la espectroelectroquímica de transmisión en configuración paralela fue la desarrollada por Yu<sup>319</sup> ese mismo año. Era una celda espectroelectroquímica de largo camino óptico en la que dependiendo de la configuración elegida se puede utilizar para estudios de absorción UV-Visible (Figura 3.22), de fluorescencia o de Raman.

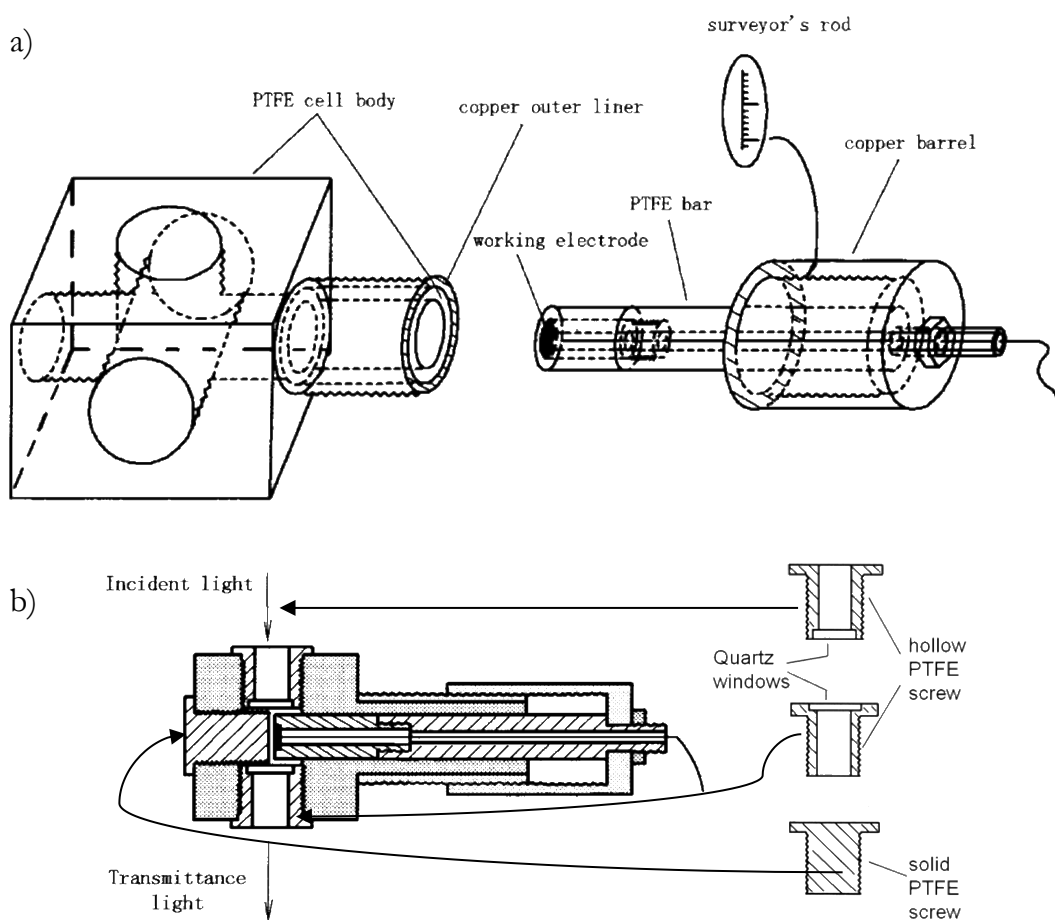


Figura 3.22 a) Montaje de la celda espectroelectroquímica, b) planta de la celda espectroelectroquímica<sup>319</sup>.

La celda estaba formada por un cuerpo cúbico de politetrafluoroetileno, (PTFE) con un hueco interior. En varias caras del cuerpo de la celda se incrustaron ventanas de cuarzo, y en otra cara se colocó un saliente con un revestimiento de cobre con rosca. El electrodo de trabajo se diseñó especialmente para esta celda utilizando un disco metálico de 8 mm de diámetro que fue embutido en un

cilindro de PTFE en el que previamente se había realizado un orificio en el centro para poder realizar la conexión eléctrica del WE con un cable. En la parte posterior del cilindro se montó un cuerpo de cobre con una rosca hembra mecanizada en el interior. Tanto en el exterior de la tuerca como el revestimiento exterior del tornillo de cobre se marcó una escala en fracciones de milímetro de forma que se pueda variar el espesor de la capa fina de la celda mediante un ajuste de la posición, enroscando o desenroscando el tornillo de la tuerca del cuerpo de cobre. Para realizar un experimento se colocaba el cuerpo de cobre anclado a la celda enfrente del electrodo de trabajo y se empujaba a éste al interior de la cámara de la celda hasta que se formaba una capa delgada entre el electrodo de trabajo y la ventana de cuarzo. Se utilizó *o*-tolidina para validar la celda mediante la realización de voltamperometrías cíclicas a varias velocidades.

En 2001 Ruzgas<sup>320</sup> desarrolló una celda espectroelectroquímica para trabajar con pequeños volúmenes de muestra, menores de 1 mL (Figura 3.23). Esta celda fue diseñada para estudiar sustancias biológicas de las que muchas veces no es posible disponer de grandes volúmenes de muestra. La celda estaba compuesta por un capilar de oro de 1 cm de largo y un diámetro interno de 200  $\mu\text{m}$  que funcionaba como electrodo de trabajo. Como celda, éste se embutió en unas cruces de PEEK, que posteriormente se alojaron en una pieza de teflón. Se utilizaron fibras ópticas de 50  $\mu\text{m}$  tanto para hacer llegar la luz a la celda como para recoger la señal transmitida. Las fibras ópticas se colocaron en ambos extremos de los tubos de PEEK enfocando al capilar de oro. Para facilitar el correcto ajuste entre las fibras y el capilar de oro, las fibras se situaron sobre unas vías de acero inoxidable. El llenado de la celda se realizaba por uno de los orificios de las cruces de PEEK que estaba colocado en posición perpendicular al capilar de oro y a la fibra óptica. En la pieza del orificio de entrada de la muestra se colocaba el contraelectrodo, en este caso un hilo de platino. Por su parte, el electrodo de referencia estaba situado en la otra pieza en forma de cruz de PEEK situada en la parte posterior del capilar de oro. En el orificio opuesto a éste se

encontraba el orificio de salida de la disolución. Posteriormente, en 2004 los autores realizaron pequeñas modificaciones en esta celda que facilitaban el estudio de procesos de transferencia electrónica de diferentes compuestos de origen biológico<sup>163,321</sup> (Figura 3.24).

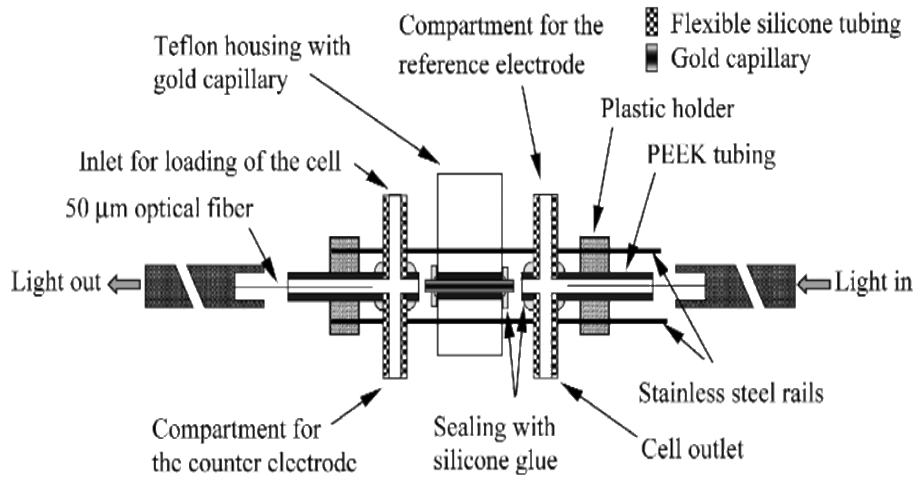


Figura 3.23 Representación esquemática de la celda de PEEK para trabajar con pequeños volúmenes de disolución<sup>320</sup>.

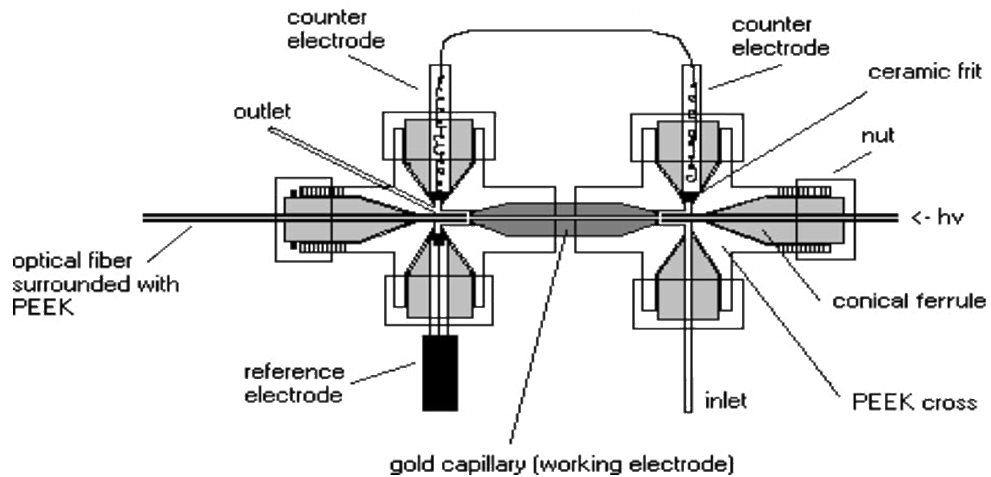


Figura 3.24 Esquema de la celda espectroelectroquímica de PEEK modificada. El electrodo de trabajo, un capilar de oro, se encuentra entre dos piezas de PEEK en forma de cruz, donde entra en contacto con la fibra óptica. El contraelectrodo se sitúa en ambas piezas de PEEK. El electrodo de referencia de Ag/AgCl, se sitúa en una de las piezas de PEEK cerca del electrodo de trabajo<sup>321</sup>.

En el 2001 Daniel y Gutz desarrollaron una celda espectroelectroquímica de capa fina de largo camino óptico (LOPTLC) adaptable a una cubeta comercial de cuarzo tanto para el estudio de sistemas estaticos<sup>322</sup> como en flujo<sup>323</sup> (Figura 3.25). La idea de este desarrollo fue realizar un dispositivo económico y compatible con los espectrofotómetros comerciales, de tal manera también se utilizaron electrodos de trabajo de oro desarrollados y validados por Angnes<sup>324,325</sup>. Estos interesantes electrodos se fabricaban a partir de discos compactos (CDs) por lo que se denominaron “CDtrodos”. Estos electrodos de trabajo se conseguían eliminando el revestimiento polimérico que recubre la capa de oro que poseen los discos mediante un ataque químico sumergiéndolos en un baño de ácido nítrico concentrado y posteriormente lavándolos con agua, dejando al descubierto la película de oro.

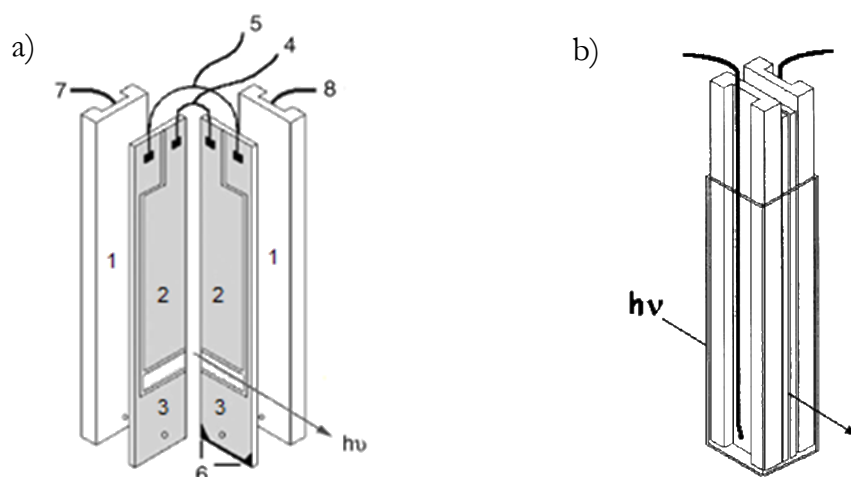


Figura 3.25 Representación esquemática de la celda espectroelectroquímica con CDtrodos a) desmontada y b) una vez ensamblada dentro de la cubeta espectroscópica. (1) Piezas de material acrílico, (2) área del electrodo de trabajo del Au-CDtrodo, (3) área del electrodo auxiliar, (4) conexión eléctrica del WE, (5) conexión eléctrica del electrodo auxiliar, (6) separadores de silicona de 200  $\mu\text{m}$ , (7) electrodo de referencia de Ag/AgCl, (8) entrada y salida de la disolución<sup>322</sup>.

El dispositivo estaba formado por dos cuerpos de material acrílico en forma de U que soportan al electrodo de trabajo y al contraelectrodo. Estos dos electrodos

estaban realizados a partir de CDtrodos de oro, utilizando para ello dos láminas simétricas con las correspondientes conexiones eléctricas. Estas dos láminas estaban separadas por unos espaciadores de 200  $\mu\text{m}$ . El electrodo de referencia, que tenía un puente salino, se colocaba en la parte exterior de uno de los cuerpos en forma de U. La entrada y la salida del flujo, cuando era necesario, se realizaba a través de la parte exterior del otro cuerpo en forma de U. El haz de luz se hacía pasar entre de las dos láminas que forman el electrodo de trabajo. La celda fue validada con *o*-tolidina dando buenos resultados tanto espectroscópica como electroquímicamente, trabajando tanto en estado estacionario como en flujo.

Siguiendo con el orden cronológico, en el 2003 nuestro grupo de investigación dirigido por el profesor López-Palacios diseñó una nueva celda espectroelectroquímica<sup>326</sup> LOPTLC basada en una celda espectroelectroquímica bidimensional<sup>327</sup> desarrollada anteriormente. La celda (Figura 3.26) tenía un tamaño adaptado al de las cubetas espectroscópicas convencionales de cuarzo, lo que compatibiliza su uso con los instrumentos comerciales. La celda constaba de dos cuerpos de resina epoxi separados por espaciadores de poliestireno dejando una separación entre las piezas de resina de 3.5 mm. El electrodo de trabajo estaba embutido en una de las piezas de epoxi. Esta pieza está compuesta por una lámina de platino soldada a un hilo de cobre por la parte posterior. La lámina de platino y el cable fueron incrustados en la resina mediante calentamiento a alta presión formando una pieza compacta que posteriormente fue cortada y pulida hasta tener la forma final. La otra pieza de resina inerte tenía como función limitar el espacio de difusión de las especies para conseguir la capa fina. El electrodo de referencia era de Ag/AgCl/KCl 3 M y se colocaba en una posición cercana a la lámina de platino, pero ligeramente elevada para no obstaculizar el camino óptico. El electrodo auxiliar era un hilo de platino que se colocaba en la parte exterior de la pieza de epoxi inerte con el fin de que las posibles reacciones secundarias que pudieran generarse en él no interfirieran en el camino óptico.

El dispositivo se utilizó para el estudio de sistema hexacianoferrato (III)/(II) donde se determinó el potencial formal del par coincidiendo los valores con los recogidos en bibliografía. También se detectaron especies secundarias generadas durante la reacción deduciéndose que éste no era un proceso de transferencia de electrones sencilla como en un principio se pensaba.

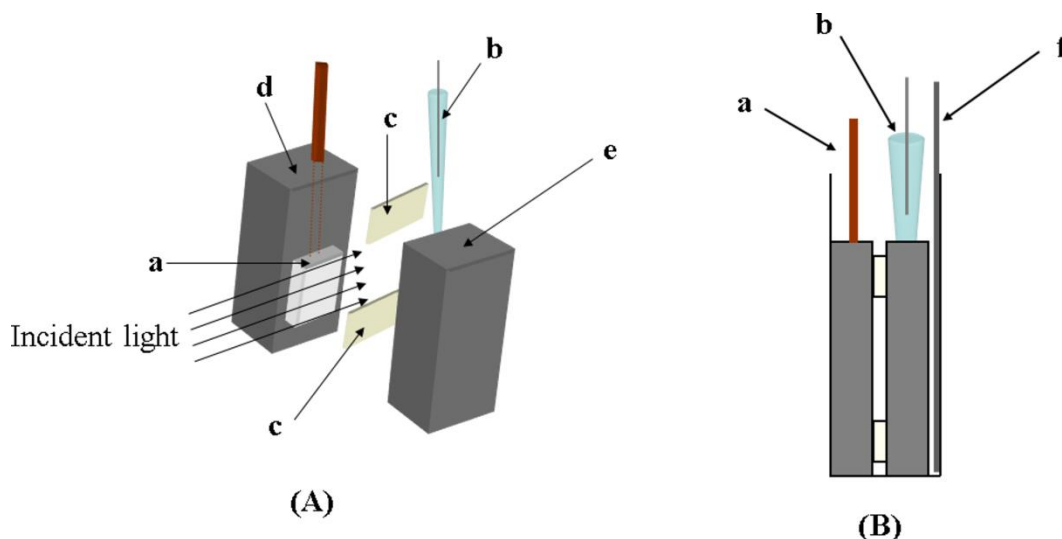


Figura 3.26 A) Montaje de la celda espectroelectroquímica, B) Vista frontal de la celda espectroelectroquímica. a) Electrodo de trabajo, b) electrodo de referencia de Ag/AgCl/KCl, c) espaciadores, d) pieza epoxi que soporta al electrodo de trabajo, e) bloque inerte de epoxi, f) contraelectrodo<sup>326</sup>.

En 2006 Isago<sup>328</sup> desarrolló una celda espectroelectroquímica de largo camino óptico (Figura 3.27) para el estudio de ftalocianinas debido a su interés en el tratamiento de cáncer de piel como fotosensibilizador en terapias fotodinámicas. Además, este estudio sirvió como soporte para el estudio de sustancias como la clorofila y enzimas del grupo hemo, debido a la similitud con el anillo porfirínico que poseen estas sustancias. El estudio espectroscópico de ftalocianina es bien conocido, sin embargo no existen muchos estudios que se centren en las propiedades de las ftalocianinas oxidadas y reducidas, así como en los procesos de transferencia electrónica.



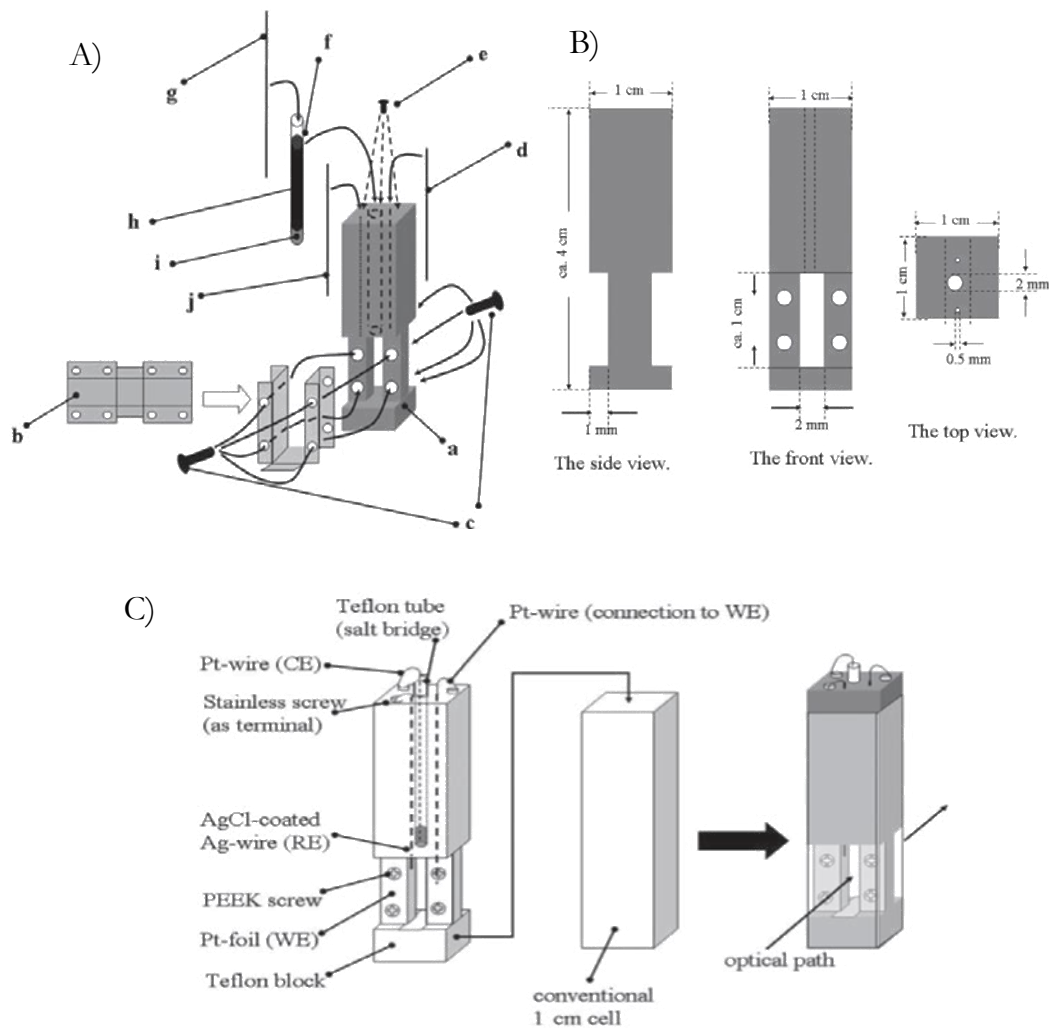


Figura 3.27 Celda espectroelectroquímica de largo camino óptico para el estudio de ftalocianinas. A) Montaje de la celda: a) cuerpo de teflón, b) lámina de platino (electrodo de trabajo), c) tornillos de PEEK, d) electrodo de referencia, e) tornillos de acero inoxidable, f) tubo de teflón, g) contraelectrodo h) puente salino, i) punta de vidrio poroso, j) conexión del electrodo de trabajo. B) Vista lateral, vista frontal y planta del cuerpo de teflón. C) Esquema de la celda espectroelectroquímica<sup>328</sup>.

La celda estaba compuesta por un bloque de teflón en el que se realizaba una cavidad en la parte inferior y se mecanizaban tres orificios desde la parte superior hasta la cavidad. La zona de la pieza en contacto con la disolución se recubría con una lámina de platino que actuaba como electrodo de trabajo. Éste se anclaba al cuerpo de teflón mediante tornillos de PEEK, de esta manera se evitaba el uso de

adhesivos que podrían aportar impurezas o crear interferencias o reacciones acopladas indeseables durante los experimentos. El electrodo de trabajo estaba unido a un hilo de platino situado en uno de los orificios anteriormente mencionados para realizar el contacto eléctrico por la parte superior de la celda. El contraelectrodo, otro hilo de platino, se situaba en otro de los orificios y se separaba con una pieza de vidrio poroso de la cavidad donde se situaba la disolución. Este dispositivo estaba pensado para poder ser alojado en el interior de una cubeta de cuarzo comercial. Para añadir la disolución, se introducía en primer lugar la celda en la cubeta, a continuación se añadía la disolución por el orificio donde más adelante se colocaba el puente salino para el electrodo de referencia. Este dispositivo fue diseñado con una gran superficie del electrodo de trabajo para conseguir rápidamente una electrolisis total de la especie de interés.

En 2007, Flowers<sup>329</sup> publicó una celda de fibras ópticas útil para estudios espectroelectroquímicos (FOSEC) con la idea de estudiar iones de metales pesados que pueden presentar un peligro ambiental. Testearon la celda con el par  $\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^0$  mediante cronoamperometría y cronoabsorciometría. Con el fin de realizar el estudio utilizaron una celda de flujo con fibras ópticas comerciales a la que incorporaron los electrodos de trabajo y de referencia en el orificio de entrada de flujo, y el contraelectrodo en el orificio de salida del flujo. Seguidamente se evaluó con ferricianuro potásico la celda modificada, verificando que no había grandes caídas óhmicas y que era posible llevar a cabo los experimentos espectroelectroquímicos. Posteriormente se llevó a cabo el estudio del par  $\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^0$  utilizando un electrodo de trabajo de platino.

También se llevaron a cabo medidas de fluorescencia con esta celda colocando, en este caso, el electrodo de trabajo en el lugar en el que previamente estaba colocada la fibra de iluminación. Se utilizó una fibra bifurcada para excitar y recoger la radiación emitida que se colocó donde anteriormente estaba situada la fibra que llevaba la luz transmitida al espectrómetro. Se comprobó que en esta configuración los resultados eran también satisfactorios. Finalmente, se

determinó que era necesario mejorar la sensibilidad de las medidas de absorbancia en configuración paralela.

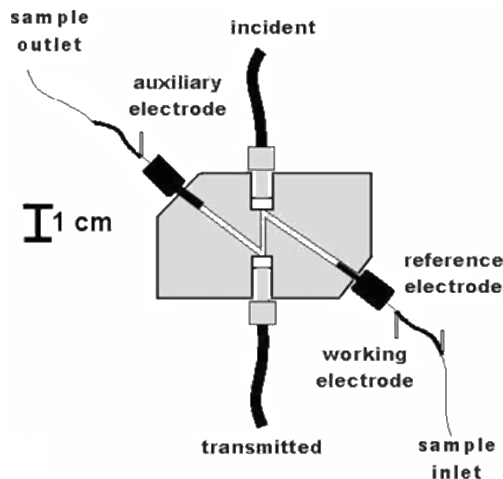


Figura 3.28 Esquema de celda FOSEC de absorbancia<sup>329</sup>.

En 2009 Colina publicó un artículo<sup>330</sup> con un estudio comparativo entre dos nuevas celdas espectroelectroquímicas diferentes para el estudio en paralelo de ITIES (Figura 3.29). Para validar ambas celdas se utilizó como sistema químico la transferencia de tris(2,2'-bipiridina)rutenio (II), ( $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ ) a través de la interfase agua/1,2-dicloroetano (1,2-DCE) debido a que es un proceso ampliamente estudiado y bien conocido.

La primera celda, Figura 3.29.a, estaba basada en una celda anteriormente diseñada para el estudio espectroelectroquímico de interfases L/L desarrollada por Hill.<sup>331</sup> La celda constaba de un cuerpo cilíndrico de vidrio con dos capilares de Luggin para los electrodos de referencia, uno para cada fase. Los contraelectrodos eran dos mallas de platino unidas a dos hilos de platino por donde se realizaban los contactos eléctricos, una para cada fase. El hilo de platino del contraelectrodo situado en la parte inferior, fue aislado para evitar el contacto con la fase acuosa situada en la parte superior. Se eligió esta celda para estudios espectroelectroquímicos en interfases L/L por los buenos resultados obtenidos previamente en los estudios únicamente electroquímicos.

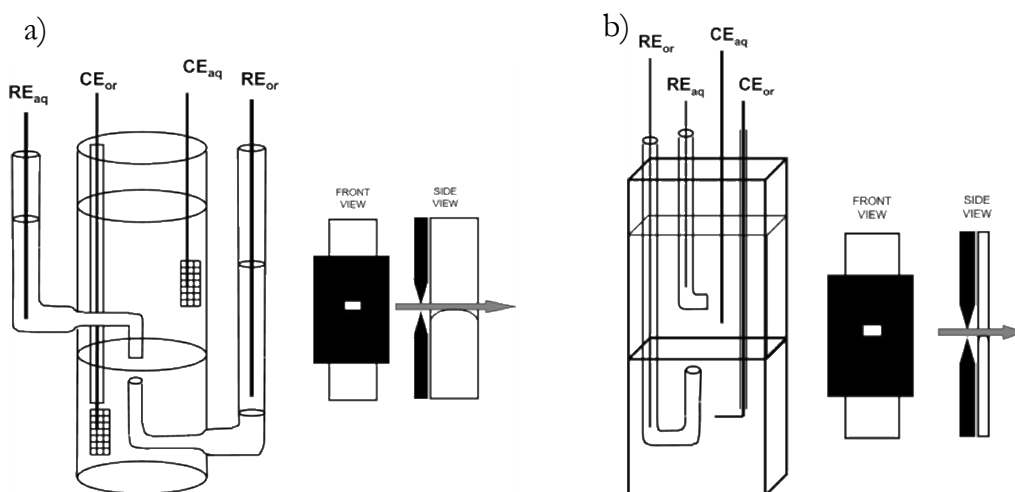


Figura 3.29 Celdas espectroelectroquímicas para el estudio de interfases L/L. a) Celda cilíndrica con dos capilares Luggin externos para ubicar los electrodos de referencia. b) Celda basada en una cubeta espectroscópica comercial<sup>330</sup>.

La segunda celda, Figura 3.29.b está construida en una cubeta espectrofotométrica comercial de cuarzo, de dimensiones (42 x 10 x 2 mm). La razón de utilizar una celda con una camino óptico de 2 mm y no de 10 mm, como son las más habituales es obtener la mayor planaridad posible en la interfase y evitar así la formación de un menisco pronunciado. Los electrodos de referencia fueron introducidos en sendos capilares Luggin y estos fueron situados posteriormente en el interior de la celda. Los contraelectrodos fueron dos hilos de platino, protegiéndose el electrodo auxiliar de la fase inferior, al igual que en la otra celda, para evitar el contacto con la fase superior. Después de estudiar la transferencia de  $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$  a través de la interfase L/L polarizada se concluyó que las dos celdas son válidas para el estudio espectroelectroquímico en configuración paralela de ITIES. Sin embargo aunque la primera celda se caracteriza por un montaje más simple puesto que los electrodos de referencia se insertan en los laterales de la celda, la segunda celda proporciona mejores resultados espectroscópicos puesto que la celda es de cuarzo lo que permite observar un rango mayor de longitudes de onda que con el vidrio. Además, al ser una celda rectangular posee una longitud de camino óptico bien conocida, difícil

de lograr con la otra celda, ya que al ser cilíndrica la determinación del camino óptico tiene que realizarse antes de cada experimento.

Flowers y Strickland desarrollaron en 2010 una celda para estudios espectroelectroquímicos en microescala<sup>332</sup>. Esta celda fue diseñada con la idea de poder analizar espectroelectroquímicamente pequeñas cantidades muestras, ya sea por la dificultad de obtener la especie, por el alto precio de la misma, o por su alta toxicidad. Con este fin, diseñaron la celda mostrada en la Figura 3.32 que utilizaba volúmenes de entre 1 y 5  $\mu\text{L}$ . Tanto la base de la celda como la pieza superior fueron realizadas en polimetilmetacrilato (PMMA) de 3 mm de grosor para dar consistencia a la celda. En ambas piezas se mecanizaron cuatro orificios para la posterior sujeción de la celda con tornillos y además a la pieza superior se le realizaron tres orificios adicionales, dos de 6.4 mm de diámetro para el electrodo auxiliar y el electrodo de referencia y otro de un diámetro menor, de 1.6 mm, para el electrodo de trabajo. Por este último orificio se adicionaba también la disolución. Sobre la pieza base de PMMA se colocó una lámina de nafi3n que fue previamente hidratada con una disolución de  $\text{KNO}_3$  1 M. Esta hoja de nafi3n era la encargada de facilitar el intercambio i3nico entre los distintos pocillos donde se encuentran los diferentes electrodos y la disoluci3n problema. Posteriormente, se coloc3 sobre la lámina de nafi3n una pel3cula de Parafilm que actuaba como junta para evitar fugas de disoluci3n. Esta pel3cula posee sendos orificios a los de la pieza superior de PMMA para las zonas donde se situaran los electrodos. El electrodo de trabajo es un hilo de platino enrollado en forma de espiral de manera similar a un muelle de forma que la disoluci3n quede en el espacio interior de la bobina. Para verificar la funcionalidad de la celda, se valid3 estudiando el par ferricianuro/ferrocianuro. Para el estudio espectrosc3pico se hizo incidir la luz desde la parte inferior de la celda usando la base de PMMA como ventana de la celda. De este modo la luz pasaba por el espacio interior de la bobina de platino a trav3s de la disoluci3n de ferricianuro pot3sico.

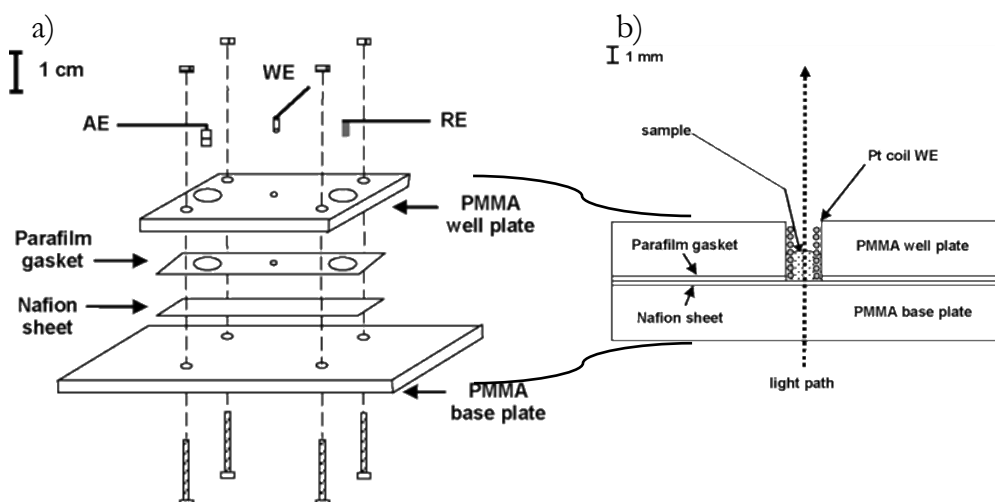


Figura 3.30 a) Esquema del montaje de la celda espectroelectroquímica para trabajar a microescala. b) Corte de la sección donde se ubica la disolución<sup>332</sup>.

En 2012 Velický diseñó un dispositivo espectroelectroquímico<sup>333</sup> (Figura 3.31) a partir de otro dispositivo diseñado anteriormente<sup>334</sup>. Este dispositivo se utilizó para el estudio de la permeación de fármacos a través de membranas artificiales. La intención era predecir la absorción transcelular de estos fármacos en el cuerpo humano por transferencia iónica de especies de un lado a otro de la membrana celular. El dispositivo consta de dos compartimentos separados por una membrana permeable hidrófoba de polifluoruro de vinilideno (PVDF). En cada uno de los compartimentos se colocaba una disolución dadora y aceptora del fármaco que migraba de una a otra fase a través de la membrana. La fase dadora se colocaba en el compartimento donante. Éste está formado por un tubo de vidrio, el cual tiene en la parte inferior la membrana permeable. En el interior del tubo de vidrio se situó un sistema de agitación de la disolución mediante una pieza en forma de paleta rotatoria para simular el movimiento de flujo fuera de la celda. El compartimento aceptor, en la parte inferior estaba formado por una pieza de politetrafluoroetileno equipado con ventanas de cuarzo y fibras ópticas a la altura de la membrana para poder estudiar espectroscópicamente la migración de la especie a través de la misma. El sistema estaba basado en un sistema de cuatro electrodos, situando un electrodo de referencia y un electrodo auxiliar en

cada una de los compartimentos. De este modo se puede crear una diferencia de potencial entre las fases, polarizando así la membrana y ayudando a la transferencia de la iónica de la especie de estudio desde la fase dadora hasta la fase aceptora. Ambas fases son disoluciones acuosas con tampón fosfato, solo que en la fase dadora se ha añadido el ion objeto de estudio, violeta de metilo.

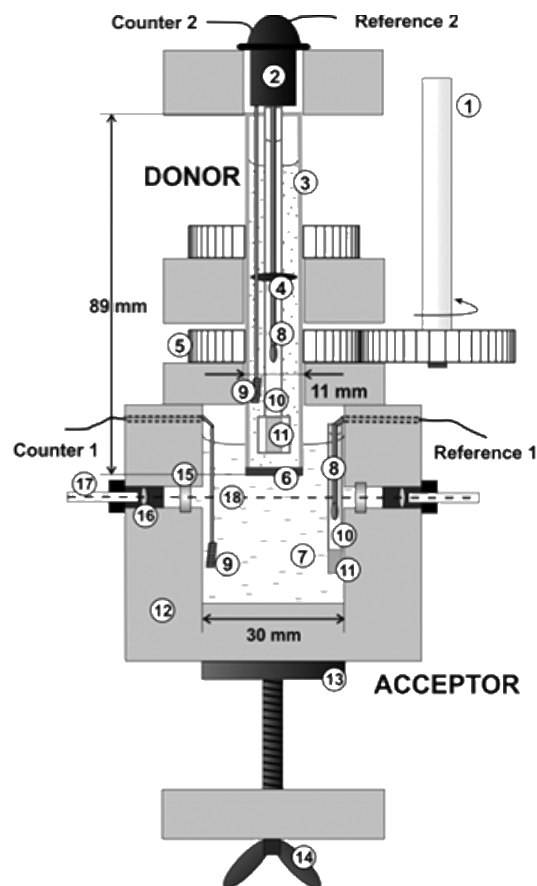


Figura 3.31 Celda electroquímica para el estudio de fármacos. (1) Controlador de la rotación, (2) paleta, (3) tubo de vidrio (compartimento donador), (4) disco separador, (5) rueda dentada de PTFE unido al tubo de vidrio, (6) membrana líquida, (7) disolución de aceptor, (8) RE Ag / AgCl, (9) CE Pt, (10) disolución saturada de KCl (disolución interna del RE), (11) vidrio fritado, (12) cuerpo de PTFE, (13) cojinete de acero, (14) tornillo de la almohadilla de acero, (15) ventana de cuarzo, (16) lente de cuarzo, (17) fibra óptica, (18) camino óptico<sup>333</sup>.

El estudio del efecto de la polarización de la membrana se realizó mediante diferentes experimentos de voltamperometría cíclica y cronoamperometría. Los resultados fueron satisfactorios en lo relativo a la migración de la especie iónica desde la fase dadora hacia la fase aceptora. Esto fue confirmado gracias a los datos espectroscópicos obtenidos por la sonda situada en la disolución próxima a la membrana en el compartimento de la fase aceptora.

En 2013 el grupo de Koder en colaboración con Cerda desarrolló una celda electroquímica de capa fina en configuración paralela mediante una impresora 3D<sup>335</sup>. La novedad de este trabajo consistía en la posibilidad de crear un dispositivo de medida adaptable a una cubeta comercial de cuarzo para realizar electroquímica en configuración paralela de una forma sencilla. En este caso no fue necesario un posterior mecanizado adicional de las piezas para realizar los canales y orificios por los que se introducían los electrodos (Figura 3.32). La celda fue diseñada mediante un programa de ordenador y posteriormente impresa mediante una impresora 3D en un polímero acrílico. La pieza se moldeó en forma de U siendo la abertura central de 0.5 mm de grosor. Adicionalmente en uno de los brazos de la pieza se diseñaron unos canales para poder introducir un hilo de platino, como electrodo auxiliar, y el electrodo de referencia de Ag/AgCl. El electrodo de trabajo constaba de dos láminas de oro de 250  $\mu\text{m}$  de espesor situadas en las dos caras interiores del orificio de la pieza acrílica elaborada con la impresora 3D. Esas dos láminas de oro estaban unidas mediante otra pieza de oro en la parte inferior que hacía las veces de separador y de contacto eléctrico entre las dos láminas de oro del electrodo de trabajo. En la cara del electrodo de trabajo adyacente al espacio se situaron el contraelectrodo y el electrodo de referencia realizando orificios para facilitar el contacto entre estos electrodos y la disolución. En la tapa de la cubeta se anclaron el contraelectrodo, el electrodo de referencia y un hilo de oro que era el contacto eléctrico con el electrodo de trabajo. Cuando se cerraba la tapa se creaba un espacio estanco. Por último, se hacía pasar una corriente de nitrógeno a través de unos orificios de



entrada y salida realizados en la tapa de la celda para, así, desoxigenar la muestra.

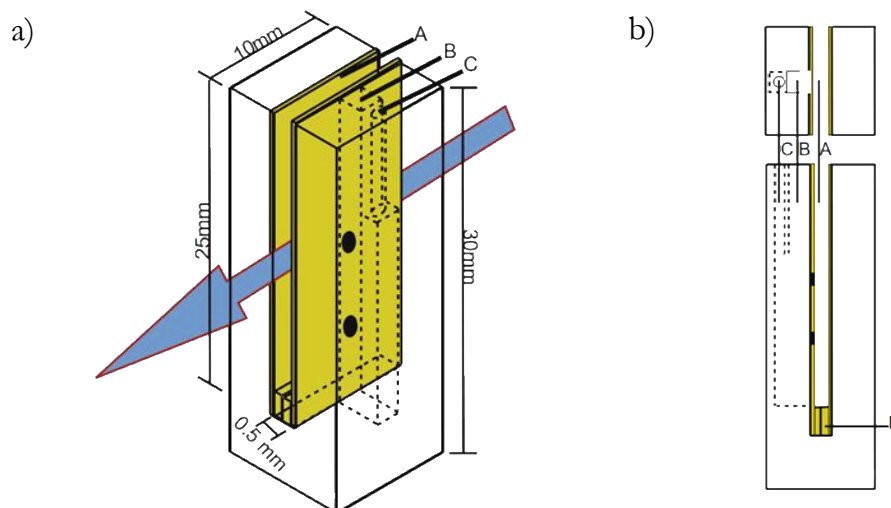


Figura 3.32 a) Esquema de celda espectroelectroquímica realizada mediante impresión 3D: (A) electrodo de trabajo de oro, (B) canal del electrodo de referencia, (C) canal del contraelectrodo, (D) espaciador de la lámina de oro. b) Vista lateral de la celda. Los puntos negros son agujeros perforados en el electrodo de trabajo para habilitar las conexiones entre compartimentos<sup>335</sup>.

La celda se validó estudiando la cinética de la transferencia electrónica del ferrocianuro potásico. Posteriormente se estudiaron tres compuestos más, la safranina O, el citocromo C y la hemoproteína artificial HH realizando la electrolisis total de los mismos. Debido a la gran área superficial del electrodo, junto a la pequeña cantidad de volumen necesaria de la muestra, en torno a 200  $\mu\text{l}$ , y el largo camino óptico de la celda, 1 cm, este dispositivo permite electrolizar completa y rápidamente el compuesto, pudiendo evaluarse muestras de baja solubilidad como es el caso de varias proteínas.

También en 2013, Cerda<sup>336</sup> desarrolló una celda muy similar a la de la Figura 3.32, aunque esta vez sin el empleo de una impresora 3D (Figura 3.33). La celda consistía en una cubeta comercial de cuarzo, en la cual se introdujo y se fijó una pieza de teflón para disminuir la cantidad de disolución problema. A un lado de esta pieza de teflón se colocó un electrodo de trabajo formado por dos

láminas de oro de 0.25 mm de grosor, enfrentadas entre sí y separadas por la parte inferior, por otra pieza de oro de 2 mm de grosor que además funcionaba como contacto eléctrico entre las dos láminas. Las piezas estaban unidas por la parte superior a un hilo de oro de 1 mm de grosor que actuaba de contacto eléctrico. El electrodo auxiliar, un hilo de platino, se colocó al otro lado de la pieza de teflón para evitar que las posibles reacciones que puedan ocurrir sobre este electrodo interfieran con las medidas tomadas en el electrodo de trabajo. El electrodo de referencia de Ag/AgCl se colocó entre los otros dos electrodos, en un rebaje que se había realizado en la pieza de teflón. En la tapa de la celda se realizaron cinco orificios, tres para los electrodos, y dos más para la entrada y salida del flujo de nitrógeno, que se utilizaban para mantener el sistema desoxigenado. Una vez introducidos los electrodos por los agujeros perforados anteriormente, se fijaban mediante resina epoxi para evitar la entrada de oxígeno por estos espacios. Una vez ensamblada la celda, la cubeta y la tapa se fijaban con cinta de teflón para conseguir la mayor estanqueidad posible en el dispositivo. El haz de luz se hace pasar por el espacio que queda entre las dos láminas de oro del electrodo de trabajo, cuya longitud de camino óptico es de 1 cm.

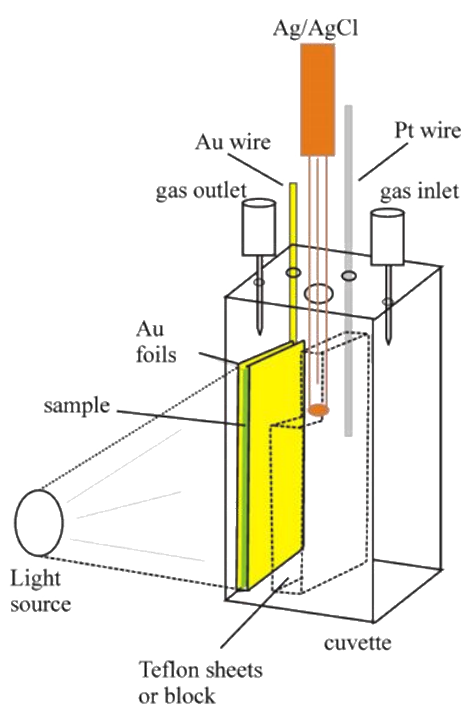


Figura 3.33 Esquema de celda espectroelectroquímica<sup>336</sup>.

Este montaje se utilizó para el estudio de muestras de, citocromo c, mioglobina, la encima horseradish peroxidasa y una lipoproteína multimérica transmembrana, el citocromo bc<sub>1</sub>. Estos estudios se realizaron mediante electrolisis total de la especie, tomando espectros durante la variación del potencial aplicado en una experiencia voltamperométrica.

### 3.2.2 Celdas bidimensionales

Las celdas espectroelectroquímicas bidimensionales combinan generalmente dos tipos de información espectroscópica, las obtenidas en configuración normal en reflexión y en configuración paralela, o las registradas en configuración normal y paralela de transmisión. La espectroelectroquímica bidimensional es una técnica nueva desarrollada por el grupo del profesor López-Palacios en la Universidad de Burgos a principios del siglo XXI<sup>327</sup>. Es una técnica de una gran potencia analítica puesto que permite obtener una información más completa del sistema estudiado y, por lo tanto, una mayor comprensión de los procesos que tienen lugar, que en cualquiera de las configuraciones monodimensionales mostradas anteriormente puede ser parcial. Esto es debido a la posibilidad de poder observar simultáneamente la disolución desde dos puntos de vista diferentes, diferenciando entre los procesos que tienen lugar en la superficie del electrodo de los que se producen en la capa de difusión. La bondad de esta técnica se hace evidente al comparar ambas informaciones espectroscópicas consiguiendo mayor información relacionada con el cómo, dónde y cuándo tienen lugar los procesos observados.

En 2001 López-Palacios<sup>327</sup> describió esta nueva técnica espectroelectroquímica así como el dispositivo elaborado para poder llevar a cabo las medidas. Este dispositivo, Figura 3.34, se diseñó pensando en que las señales espectroscópicas obtenidas mediante la configuración en normal y en paralelo, proporcionan diferente tipo de información. La celda se basa en un electrodo

ópticamente transparente de oro, aunque se puede variar el material del electrodo de trabajo dependiendo de la naturaleza del sistema a estudiar. Así, es posible hacer pasar el haz de luz tanto a través de él, transmisión en configuración normal, como en una posición paralela a la superficie del electrodo y a la disolución adyacente al mismo, transmisión en configuración paralela. Esta celda se diseñó con la idea de que pudiera ser utilizada en una celda espectrofotométrica comercial estándar.

Está compuesta por una pieza de resina epoxi con un orificio en la parte central por la que pasará el haz de luz en configuración normal. En la zona donde está el agujero se ha situado una ventana de cuarzo. En esta pieza también se ha perforado una cavidad para acomodar el microelectrodo de referencia de Ag/AgCl/KCl. En la pared opuesta a la ventana de cuarzo, entre la pieza de resina y la pared de la cubeta, se sitúa un hilo de platino que hará las funciones de contraelectrodo. A continuación se colocan dos espaciadores de grosor conocido. Estos espaciadores permiten controlar la altura del haz de luz en la configuración paralela, pues la luz pasa por el espacio que dejan. Seguidamente se coloca el electrodo de trabajo, un electrodo ópticamente transparente de oro sobre una lámina de cuarzo. Por último se colocan dos piezas de resina epoxi para mantener todo el conjunto fijo dentro de la cubeta de cuarzo.

El dispositivo se evaluó con disoluciones de *o*-tolidina de diferentes concentraciones mediante voltamperometría cíclica a diferentes velocidades. Esta técnica aparte de permitirnos obtener una información más completa de los procesos de reacción nos permite conocer cuál de las dos configuraciones espectroscópicas, normal o paralelo, otorga una mayor sensibilidad para cada uno de los sistemas de estudio. Posteriormente, se pueden realizar estudios espectroscópicos monodimensionales en la configuración de medida más adecuada para cada sistema.

Después de la validación se llevó a cabo el estudio de un sistema no difusivo con el fin de ver el potencial de la técnica en procesos de adsorción. Para

ello se eligió la electropolimerización de 4-4'-bis(metiltio)-2,2'-bitiofeno en acetonitrilo puesto que la oxidación-reducción sucesiva mediante varios ciclos voltamperométricos lleva a la generación y sucesivo crecimiento de una película polímero conductor sobre la superficie del electrodo.

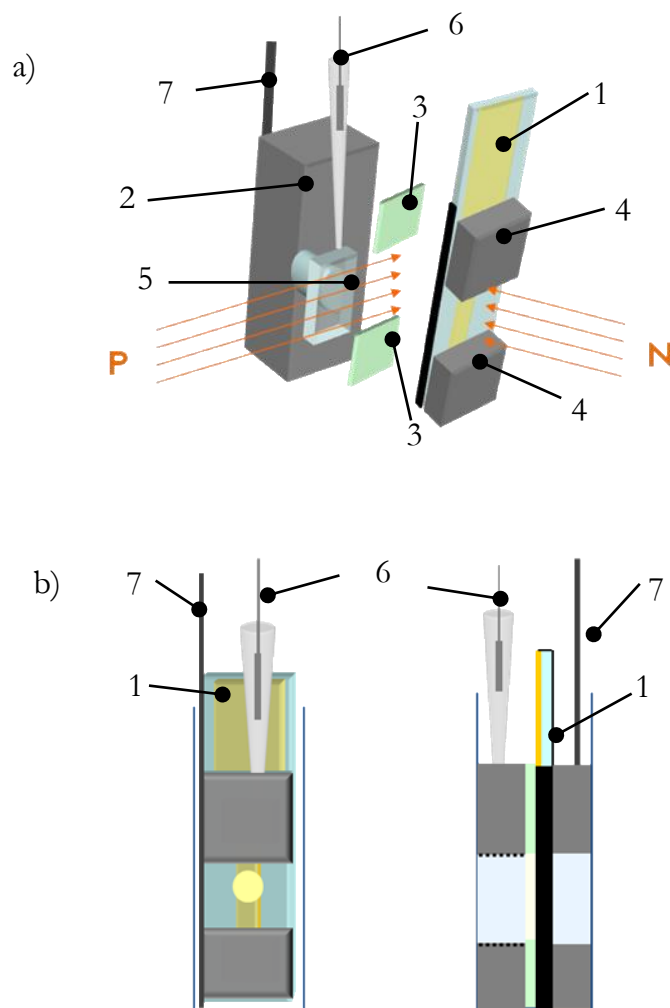


Figura 3.34 Celda espectroelectroquímica bidimensional<sup>327</sup>. a) Esquema de la celda despiezada, y b) esquema de la celda ensamblada de frente y de perfil. 1) Electrodo de trabajo, 2) pieza de resina epoxi, 3) espaciadores, 4) soportes de resina epoxi, 5) ventana circular, 6) electrodo de referencia, 7) contraelectrodo. Incidencia del haz de luz normal (N) y paralelo (P) respecto a la superficie del electrodo de trabajo.

En un proceso difusivo simple es más sensible la configuración en paralelo debido a que la longitud de camino óptico es mayor que el espesor de la capa de difusión, por lo que se obtiene una mayor señal de la absorbancia para esta

configuración. Sin embargo, en el caso de un proceso adsorptivo que se produce sobre la superficie del electrodo, la configuración paralela no permite observar el crecimiento de la película polimérica puesto que esta disposición espacial no es capaz de observar la superficie del electrodo. Solamente es sensible a los procesos que ocurren en la disolución adyacente al mismo, por lo que en este caso la disposición recomendable para estudiar el polímero sería la configuración normal.

Los experimentos realizados con este nuevo dispositivo demuestran que es capaz de estudiar de forma simultánea los distintos fenómenos que pueden producirse en un sistema obteniendo una información más completa que la espectroelectroquímica monodimensional.

Esta celda fue utilizada posteriormente para realizar un estudio más exhaustivo y la caracterización de la electropolimerización de 4-4'-bis(metiltio)-2,2'-bitiofeno<sup>337</sup>, observándose que durante los primeros ciclos en los que en la configuración normal no se aprecia aun un crecimiento de la película polimérica, la configuración paralela muestra un aumento de la señal correspondiente a la formación de oligómeros en disolución. La velocidad de formación de oligómeros se va reduciendo hasta quedar constante durante el crecimiento de la película en los sucesivos ciclos. De este modo se demostró que la polimerización se produce mediante un crecimiento en etapas, permaneciendo en disolución los oligómeros de menor longitud de cadena.

Finalmente, este mismo grupo realizó un nuevo diseño de celda bidimensional basado en una fibra de reflexión (Figura 3.35) que era adecuado para realizar estudios con electrodos que no son ópticamente transparentes<sup>338</sup>. Con el nuevo diseño se estudió la dispensación controlada por el potencial de ferrocianuro contenido en una película de un polímero conductor.

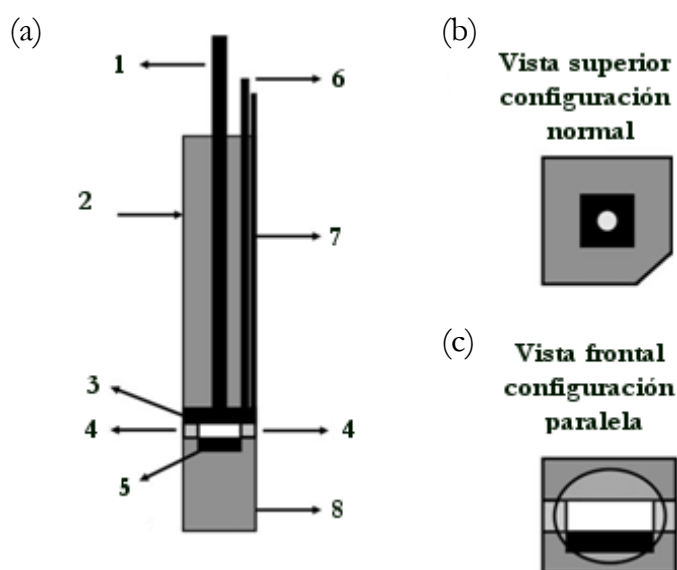


Figura 3.35 A) Celda electroquímica bidimensional, (1) sonda de reflexión, (2) pieza superior, (3) ventana de cuarzo, (4) espaciador, (5) electrodo de trabajo, (6) electrodo de referencia, (7) electrodo auxiliar, (8) pieza inferior. B) Vista superior, configuración normal, c) vista frontal, configuración paralela.

### 3.3 Dispositivo experimental

#### 3.3.1 Elementos

##### 3.3.1.1 Fuentes

En la realización de esta tesis se han utilizados tres fuentes de luz distintas, Figura 3.36. La primera de ellas ha sido una lámpara de Ocean Optics, modelo DH-2000-FHS-DUV para el estudio de ITIES. Esta fuente que combina dos lámparas, una de deuterio y otra de luz halógena de wolframio, pudiendo obtener un espectro de salida potente y estable que cubre el rango espectral UV-Vis-NIR (190-2000 nm). La segunda fuente de luz utilizada para el estudio de  $\theta$ -Va y del complejo de esta molécula con un centro metálico de cobre es una fuente de Avantes, modelo Avalights-DH-S-BAL. Esta fuente también combina una lámpara de deuterio y una lámpara halógena, pero además posee un filtro dicróico para reducir la luz del pico centrado a 656 nm, de forma que se obtenga un espectro más equilibrado a lo largo del todo su rango espectral UV-Vis-NIR

(200-2500 nm). La última fuente de luz utilizada ha sido una de Xenón Cermax modelo ASB-XE-175EX con un rango espectral de 200-1100 nm acoplada a un monocromador CM110 1/8m de Spectral Products que permite ampliar el rango espectral y con potencia mucho mayor que las anteriores.

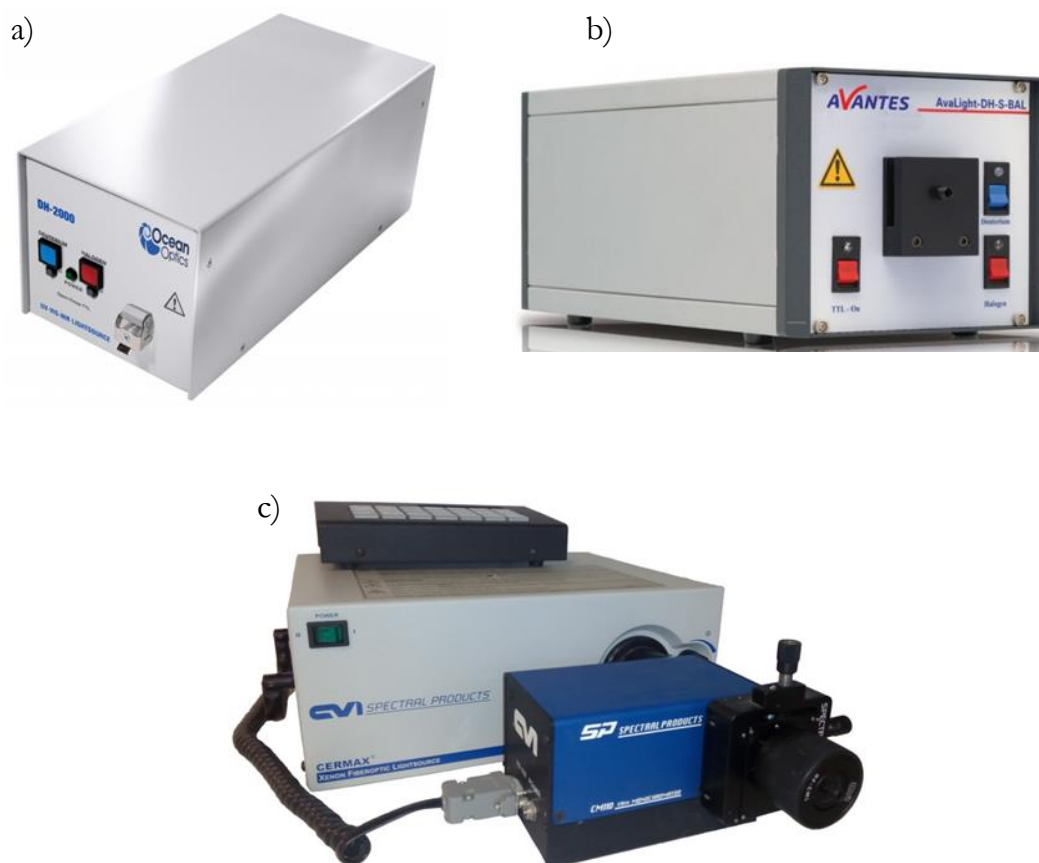


Figura 3.36 a) Fuente de luz modelo DH-2000-FHS-DUV, de Ocean Optics, b) fuente de luz Avalights-DH-S-BAL de Avantes, c) fuente de luz Cermax ASB-XE-175EX acoplada a un monocromador CM110 1/8m de Spectral Products.

### 3.3.1.2 Fibras ópticas

Para el acoplamiento de los elementos ópticos se han utilizados fibras ópticas de Ocean Optics de diferentes diámetros, tanto para conducir el haz de luz desde la fuente hasta la celda como desde la celda hasta el espectrofotómetro (Figura 3.37). Para los experimentos en bidimensional se ha utilizado una fibra



óptica bifurcada de Ocean Optics BIF200-SR, con el fin de que la luz procedente de la misma fuente sea utilizada en ambas configuraciones. Las medidas en configuración normal se han realizado mediante una sonda de reflexión Avantes, modelo FCR-7IR200-2-2.5x100 protegida con una película de Mylar. No obstante en cada apartado experimental se detallará el material específico utilizado para los diferentes estudios realizados.

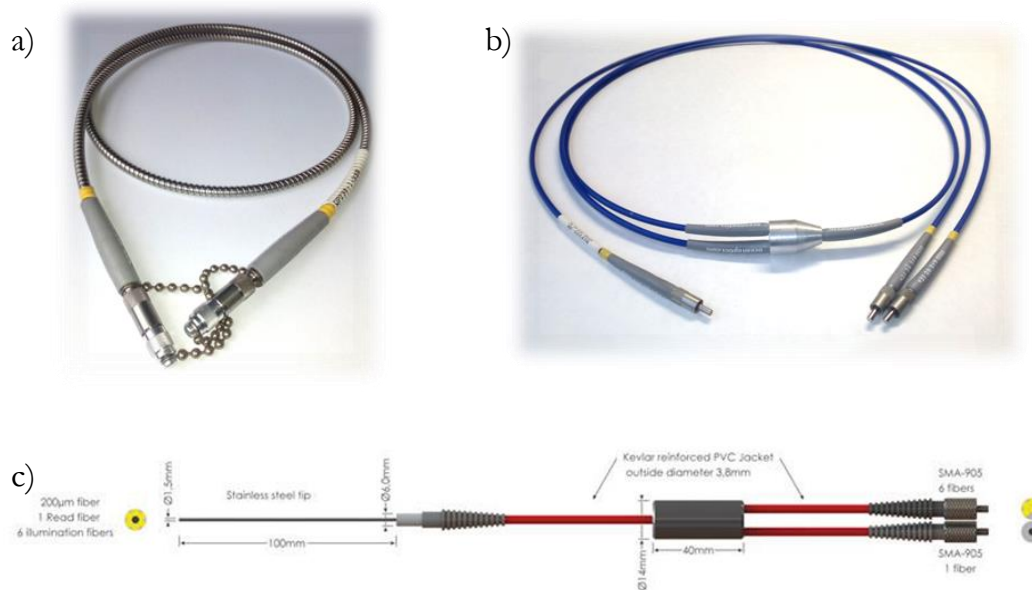


Figura 3.37 a) Fibra óptica, b) fibra óptica bifurcada, c) sonda de reflexión.

### 3.3.1.3 Espectrofotómetro

Los espectrofotómetros utilizados para recoger la información espectrofotométrica han sido QE65000 de Ocean Optics, Figura 3.38. En el interior del espectrofotómetro hay dos espejos. Cuando la luz entra en el espectrofotómetro es reflejada en un primer espejo colimador, que genera un haz de luz paralelo. Este haz colimado es reflejado sobre la red de difracción y dirigido hasta un segundo espejo de enfoque, que focaliza la radiación dispersada sobre el detector. Éste consta de una red bidimensional de 1044x64 diodos capaz de detectar un rango espectral desde 200 nm o 250 nm, según el modelo, hasta

1100 nm, abarcando todo el rango del visible, parte del ultravioleta e incluso algo de infrarrojo cercano. Por último los datos son enviados al ordenador y adquiridos mediante el software Spectrasuite.

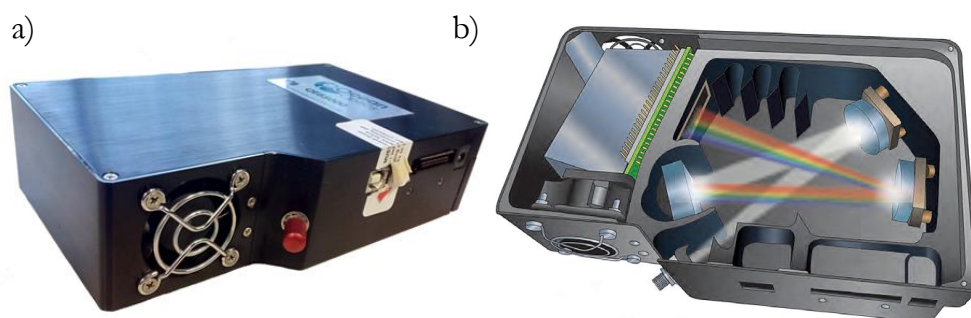


Figura 3.38 a) Espectrofotómetro Ocean Optics, QE65000. b) esquema del interior del espectrofotómetro.

#### 3.3.1.4 Posicionadores piezoeléctricos

El posicionador, Figura 3.39, es un modelo 460P-XYZ de Newport. Éste ha sido utilizado tanto para colocar el haz de luz en la posición deseada antes o durante el experimento espectroelectroquímico.

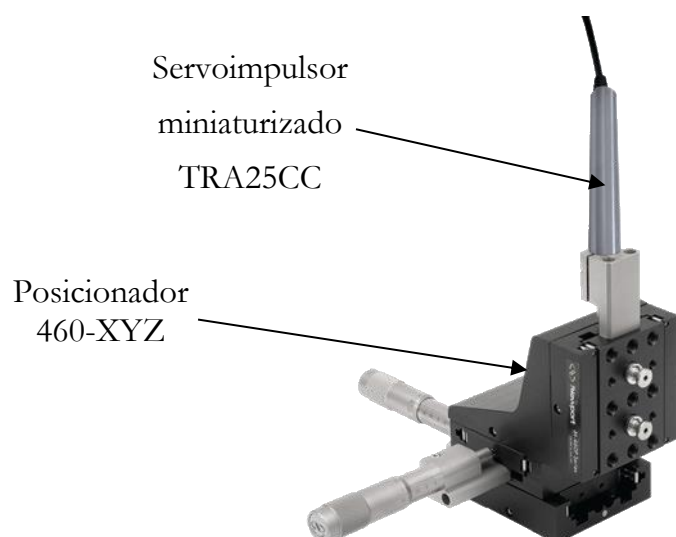


Figura 3.39 Posicionador piezoeléctrico.

El posicionador opera mediante un servoimpulsor miniaturizado TRA25CC (Newport) que permite moverse con una precisión de 10 nm con un rango de operatividad de 25 mm permitiendo controlar la posición del haz de luz en todo momento. El conjunto ha sido controlado mediante el software SMC100 (Newport) que permite manejar el movimiento en un solo eje con precisión a distintas velocidades desde 40 nm/s hasta 0.4 mm/s. De este modo, se puede controlar la posición del haz de luz en el eje Z permitiendo conocer y seleccionar la distancia entre el haz de luz y la interfase.

### 3.3.1.5 Potenciostato

Las medidas electroquímicas tomadas durante esta tesis han sido adquiridas mediante dos aparatos diferentes. El más utilizado ha sido un equipo potenciostato/galvanostato AUTOLAB PGSTAT 302N (Eco Chemie B.V.), Figura 3.40.a, el cual adquiere los datos con ayuda del software GPES 4.9. Este equipo permite un control riguroso tanto del potencial como de la corriente eléctrica que se impone al sistema. Es un instrumento versátil en cuanto a las técnicas electroquímicas que nos permite emplear, dando la posibilidad de emplear un trigger o disparador, para poder sincronizar el control y la adquisición de datos con las de otros equipos, como el sistema espectroscópico en nuestro caso. Además posee una tarjeta de adquisición rápida y utiliza un software adecuado para el tipo de experimento a realizar.

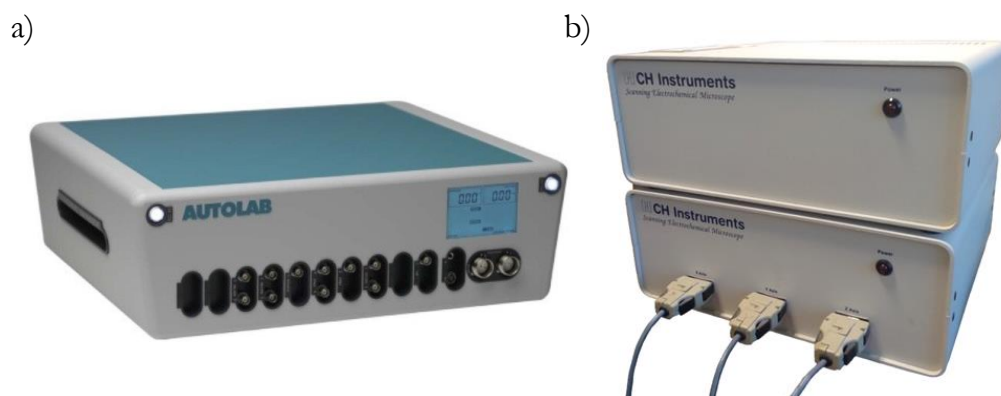


Figura 3.40 a) Potenciostato AUTOLAB, PGSTAT 302 N, b) Potenciostato CHI900, CH Instruments.

El otro equipo utilizado para el estudio electroquímico ha sido un bipotenciostato CHI900 de CH Instruments. Es un equipo completo que permite utilizar numerosas técnicas electroquímicas, además de permitir realizar estudios de microscopia electroquímica de barrido, aunque no se ha empleado para tal fin en este trabajo.

### 3.3.1.6 Espectrómetro de masas

Las medidas de espectrometría de masas de alta resolución han sido realizadas mediante un espectrómetro de masas Micromass AutoSpec (WATERS) y operado mediante el software MassLynx 4.0. Este equipo puede ionizar la muestra mediante distintos métodos como Ionización Química, Impacto Electrónico o FAB (Fast Atom Bombardment).

## 3.4 Electroodos

### 3.4.1 *Electrodo de trabajo*

#### 3.4.1.1 Electroodos comerciales

Los electroodos de trabajo utilizados durante el desarrollo de esta tesis han sido principalmente electroodos comerciales de la marca comercial BASInc. Un disco de platino de 1.6 mm de diámetro, modelo MF-2013, y un disco de carbono vitrificado de 3 mm de diámetro modelo MF-2012.

#### 3.4.1.2 Electroodos desarrollados

Al ser el objetivo de esta tesis el desarrollo de nuevos dispositivos experimentales para estudios espectroelectroquímicos en UV-Vis, no solo se ha intentado desarrollar nuevas celdas espectroelectroquímicas adaptadas a electroodos comerciales sino que también se han diseñado y elaborado diversos electroodos de trabajo, tanto para el estudio de medias de espectroelectroquímica

en capa fina como en régimen de difusión semi-infinita en configuración paralela, o para estudios de espectroelectroquímica bidimensional.

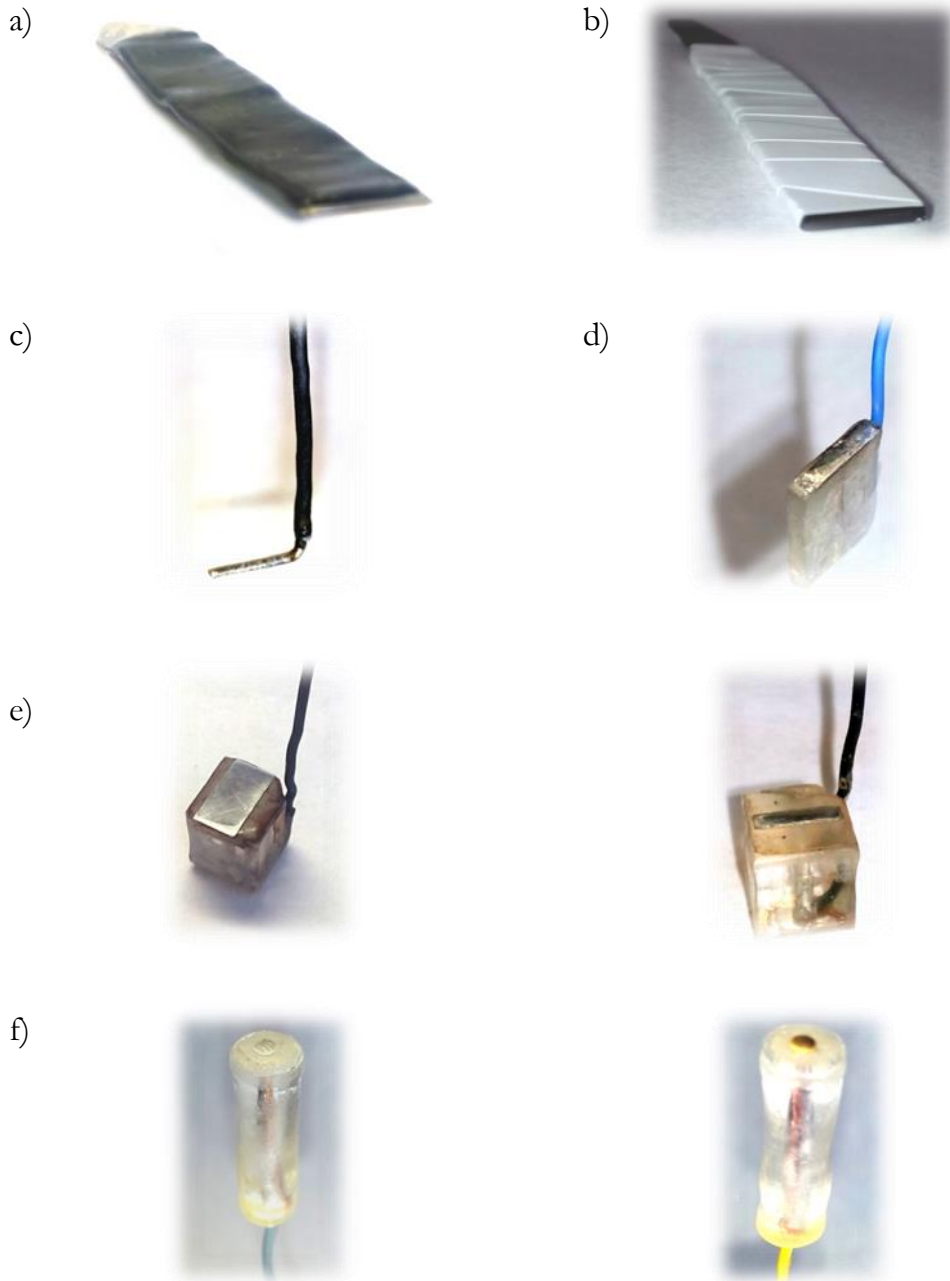


Figura 3.41 a) Lámina de platino, b) lámina de teflón, c) electrodo de trabajo en forma de L, d) electrodo de trabajo para medidas bidimensionales en capa fina, e) electrodo cuadrado para celdas de camino óptico de 10 mm, f) electrodo de disco.

Con el fin de desarrollar electrodos para realizar estudios en capa fina, se pensó en diseñar electrodos que cupieran en una cubeta espectroscópica comercial de 2 mm de camino óptico, para ello en un principio se optó por láminas de platino 8 x 0.5 mm (Figura 3.41.a) o carbono vitrificado 8.705 x 1 mm (Figura 3.41.b) protegidas por un recubrimiento de material polimérico inerte o teflón, respectivamente. De esta manera, solo existe contacto con la muestra en “el canto” de la lámina, de forma el área del electrodo sea siempre la misma para todos los experimentos. Sin embargo, los experimentos con estos electrodos de trabajo se limitaban únicamente a estudios en configuración paralelo, por lo que se propuso el diseño de otros electrodos con los que se pudiera realizar medidas de espectroelectroquímica bidimensional. Para ello primero se optó por seguir un desarrollo similar a las anteriores pero con una lámina de platino más fina en forma de L estando solo expuesta a la disolución una superficie de 1.3 x 0.7 mm (Figura 3.41.c). A continuación se intentó dar un paso más allá realizando un electrodo de trabajo con una elaboración más sofisticada para el estudio bidimensional (Figura 3.41.d). El electrodo se realizó utilizando una pieza de PMMA (2 x 9 x 10 mm) en la que se embebió una lámina de platino. Por la parte inferior se realizó un orificio para el contacto eléctrico mediante un hilo de cobre. Para evitar que la disolución pueda llegar al contacto, el orificio se selló con resina epoxi. También se desarrollaron electrodos adaptados para cubetas comerciales espectroscópicas de 10 mm de camino óptico (Figura 3.41.e). Estos fueron realizados sobre una pieza de PMMA de 9 x 9 mm de base y 10 mm de altura en el que se rebajó una esquina para poder dirigir el hilo de cobre hasta la parte inferior de la celda. Ahí se realiza la conexión con la lámina de platino, de diferente tamaño, que ejerce de electrodo. También se realizaron electrodos con el fin de utilizar las celdas desarrolladas para los electrodos comerciales, estos electrodos desarrollados eran electrodos de disco de 2 mm de diámetro embebidos en piezas de PMMA (Figura 3.41.f).

### 3.4.2 *Electrodo de referencia*

El electrodo de referencia empleado para todas las medidas fue un electrodo de Ag/AgCl/KCl 3M fabricado en el laboratorio. Para ello, un hilo de plata de 0.37 mm de diámetro se ha recubierto con cloruro de plata mediante oxidación del hilo de plata en una disolución de cloruro de litio. Para proteger el electrodo de referencia se introdujo en una punta de micropipeta. Para ello, previamente se realizó un puente salino en la punta de la punta de micropipeta mediante una solución de agar y electrolito soporte que se dejó gelificar. La punta de micropipeta se rellenó con una disolución con una disolución de KCl 3 M en la que se introdujo el hilo de Ag/AgCl y se cerró el electrodo mediante un tapón de teflón. Antes de su uso estos microelectrodos de referencia fueron calibrados frente a electrodos comerciales.

### 3.4.3 *Contraelectrodo*

Los contraelectrodos utilizados fueron hilos de platino (Advent Technologies).

## 3.5 **Tratamiento de datos**

Los experimentos espectroelectroquímicos generan una cantidad ingente de datos. Esto es debido a que la adquisición de la señal espectroscópica se realiza tomando 1044 puntos por espectro, los cuales son obtenidos generalmente, cada 0.1 segundos. Por lo tanto, la cantidad de datos registrados para un experimento pueden generar algunos registros de salida de datos lleguen a ocupar más de 200 Mb. Esto supone que los datos no puedan ser examinados directamente, sino que tienen que recibir un tratamiento previo. Para ello en nuestro grupo de investigación se han generado diferentes herramientas matemáticas. Con este fin se ha utilizado el programa matemático Matlab en el que se han desarrollado distintas funciones que permiten tanto cargar como tratar los datos de las experiencias espectroelectroquímicas.

### 3.6 Dispositivos experimentales

#### 3.6.1 *Espectroelectroquímica UV-Vis en ITIES*

En esta sección se presenta el diseño y desarrollo de un dispositivo que permite medir espectroelectroquímicamente los procesos que tienen lugar en las interfases entre dos líquidos inmiscibles. No existen dispositivos comerciales para este tipo de estudios en configuración paralela y los encontrados en bibliografía son de difícil alineamiento óptico. Debido a la naturaleza del sistema se utilizó una configuración de cuatro electrodos. Aunque el grupo había obtenido buenos resultados en esta configuración con otros dispositivos<sup>337,338</sup>, la alineación del haz de luz con la interfase era un proceso manual y tedioso, en definitiva, de gran dificultad. Por ello se desarrolló un dispositivo de rendija móvil que permite controlar la posición del haz de luz mediante un controlador piezoeléctrico, y realizar barridos espaciales de la capa de difusión a ambos lados de la interfase.

Con este propósito, como se muestra en la Figura 3.42, se acoplaron el espectrofotómetro y el potenciostato mediante un trigger o disparador para poder realizar medidas espectroscópicas y electroquímicas de forma sincronizada. Las fibras ópticas se acoplaron al nanoposicionador piezoeléctrico para realizar los barridos espaciales de forma que sean los elementos ópticos los que se muevan y no la celda, evitando perturbar el sistema.

Este nuevo dispositivo, desarrollado para trabajar en configuración paralela usando la rendija móvil consta de por 4 partes principales (Figura 3.43):

- A) Posicionador piezoeléctrico.
- B) Soporte de la rendija y las lentes.
- C) Celda espectroelectroquímica L/L.
- D) Sistema de sujeción de la celda.



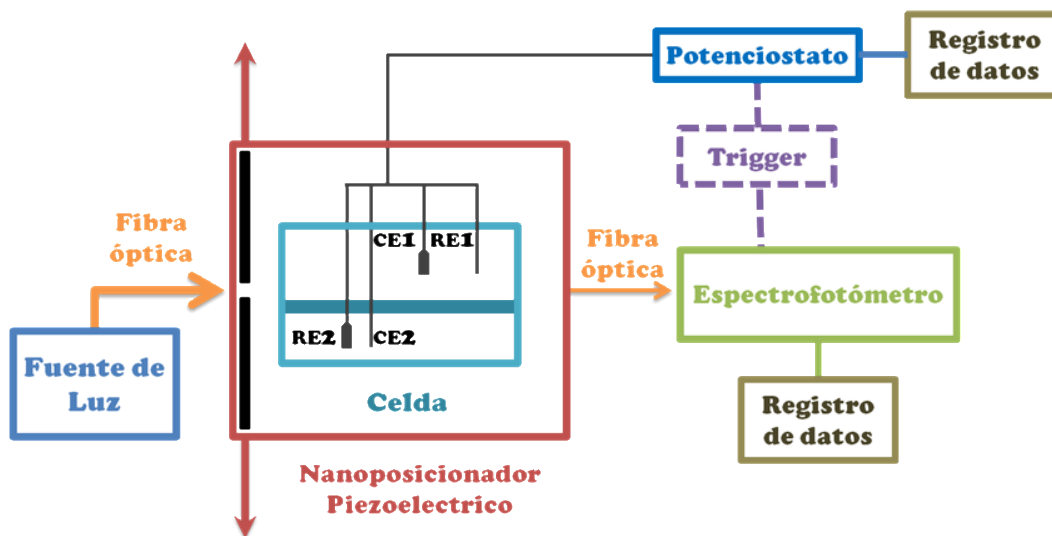


Figura 3.42 Representación esquemática del montaje experimental del dispositivo de rendija móvil para las medidas espectroelectroquímicas de barrido espacial en configuración paralela en interfaces entre dos disoluciones electroquímicas inmiscibles.

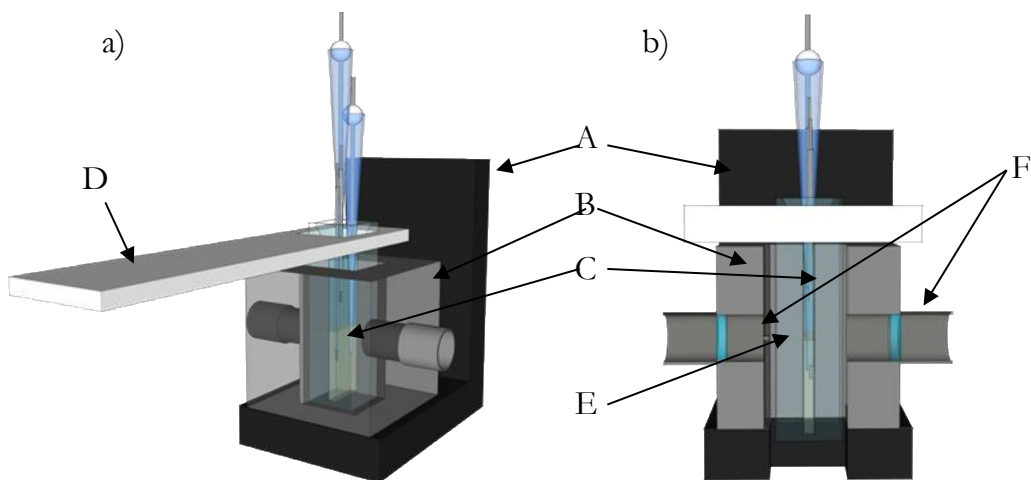


Figura 3.43 a) Representación del dispositivo de medida con rendija móvil para el estudio de interfaces L/L. b) Corte transversal del dispositivo. A) Pieza de unión al posicionador piezoeléctrico, B) pieza de soporte para las lentes y la rendija, C) celda espectroelectroquímica, D) sistema de sujeción de la celda, E) rendija de 400  $\mu\text{m}$ , F) lentes colimadoras.

Hay que indicar que la rendija ha sido situada después de la lente colimadora para asegurar que el haz de luz que pase a través de la rendija sea paralelo, es decir, esté colimado.

El posicionador piezoeléctrico TRAC25CC descrito en la sección 3.3.1.4 se ha utilizado para controlar la posición del haz de luz, tanto cuando se realizan barridos espaciales como cuando se selecciona una distancia respecto a la interfase a la que se realiza el estudio del sistema. De esta manera se consiguió que las medidas para diferentes experimentos fueran más reproducibles.

La pieza que soporta la rendija y las lentes está unida al posicionador, de forma que el impulsor motorizado transmite el movimiento a todo el conjunto consiguiendo que el haz de luz pase con gran precisión a través de la celda. La rendija se ha colocado entre dos lentes colimadoras próximas a las fibras ópticas.

La celda espectroelectroquímica para este montaje (Figura 3.44) está constituida por una cubeta de espectrofotométrica comercial de cuarzo (45 x 12 x 2 mm, 104.002F-QS, Hellma). Se ha elegido este tipo de cubeta porque al tener un camino óptico de 2 mm resulta más sencillo conseguir una interfase plana lo que facilita su estudio y asegura conocer con gran precisión el camino óptico.

El montaje de la celda (Figura 3.44) se inicia introduciendo el electrodo de referencia y el contraelectrodo en la parte inferior de la celda donde se situará la fase orgánica. El electrodo auxiliar de la fase orgánica, un hilo de platino de 0.75 mm de diámetro, se ha recubierto con vidrio para evitar el contacto con la fase acuosa. Posteriormente se procede a la adición de la fase orgánica mediante el uso de una pipeta, prestando especial atención a que la disolución no entre en contacto con la parte de las paredes de la celda donde se alojará la fase acuosa. A continuación se añade cuidadosamente la fase acuosa con una pipeta para conseguir que la interfase se mantenga lo más plana posible. Por último, se procede a introducir el electrodo de referencia y el contraelectrodo de la fase acuosa.

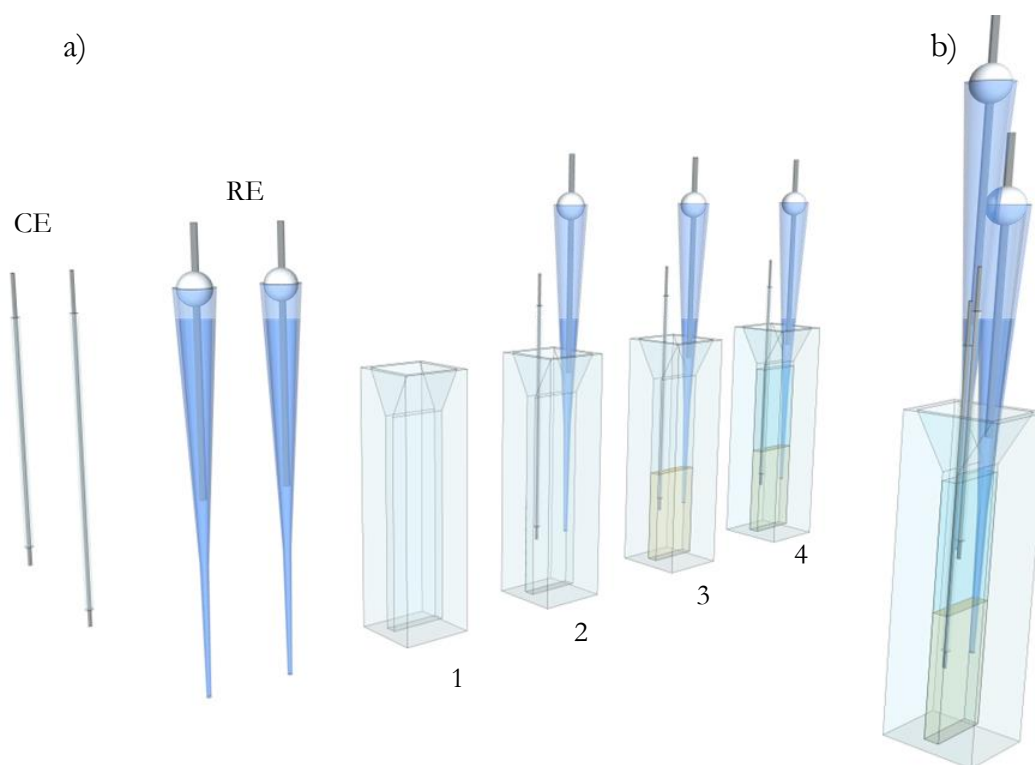


Figura 3.44 Celda electroquímica para ITIES. a) Montaje de la celda, (1) cubeta espectroscópica, (2) introducción de los electrodos de la fase inferior, (3) llenado de la fase orgánica, (4) llenado de la fase superior. b) Esquema de la celda montada. (CE) Contraelectrodos vitrificados, y (RE) electrodos de referencia.

Los electrodos de referencia han sido acomodados en capilares Luggin realizados en puntas de micropipeta, como se explicó en el apartado 3.4.2. Los electrodos de ambas fases se colocaron en una posición próxima a la interfase para minimizar la caída óhmica.

Utilizar un sistema con un volumen tan reducido para alojar un sistema de cuatro electrodos tiene varias ventajas como conseguir una mayor planaridad en la interfase o la pequeña cantidad de volumen que se necesita en comparación de otras celdas para el estudio de sistemas L/L, lo que se traduce en un menor consumo de reactivos. Sin embargo, debemos hacer hincapié en el sumo cuidado necesario para realizar el montaje de forma correcta evitando que una fase entre en contacto con la otra de forma inadecuada durante el llenado de la celda. Como

se ha dicho anteriormente, durante la introducción de la fase orgánica, se puede contaminar la parte superior de las paredes donde se va a alojar la fase acuosa. También es importante prestar atención en que la fase orgánica no suba por capilaridad entre las paredes de los electrodos de la fase orgánica y la pared de la celda, ya que se produciría el mismo problema de “ensuciar” las paredes de la fase acuosa. Por supuesto, un punto clave en el que se debe mantener especial cuidado es durante la adición de la fase acuosa, ya que es necesario hacerlo de una forma lenta y constante para evitar tanto el desmoronamiento de la interfase como la formación de burbujas de aire que se queden ocluidas entre las dos fases cuando se añade la fase superior.

### *3.6.2 Celda espectroelectroquímica para medidas espectroelectroquímicas en configuración paralela con rendija móvil*

El dispositivo experimental para las medidas espectroelectroquímicas en configuración paralela con rendija móvil es muy similar al descrito en la anterior sección 3.6.1. En este caso el posicionador se emplea para conseguir una exacta colocación del haz de luz respecto a la superficie del electrodo de trabajo. Además, permite asegurar, cuando se trabaja en un modo clásico de celda de largo camino óptico, que se está observando la disolución adyacente al mismo. Otra diferencia respecto al dispositivo para el estudio de ITIES es el uso de un sistema clásico de tres electrodos.

La celda consiste en una cubeta espectroscópica (104.002F-QS de Hellma para el montaje representado en la Figura 3.46.a y 110-QS de Hellma para los montajes de la Figura 3.46.b y Figura 3.46.c), en la que se introducen los tres electrodos ubicando el electrodo de trabajo en el centro de la cubeta, y a los lados el de referencia y el contraelectrodo, Figura 3.46.

Es importante mencionar que aunque no aparezca representado en la, Figura 3.46, los electrodos se fijaron mediante una pieza en la parte superior para

reproducir la posición de los tres electrodos y conseguir que el electrodo de trabajo quede perfectamente alineado con el haz de radiación. Además de esta manera, se mejora la reproducibilidad de los experimentos, se facilita el montaje y se evita la perturbación del sistema debido a posibles movimientos de los electrodos.

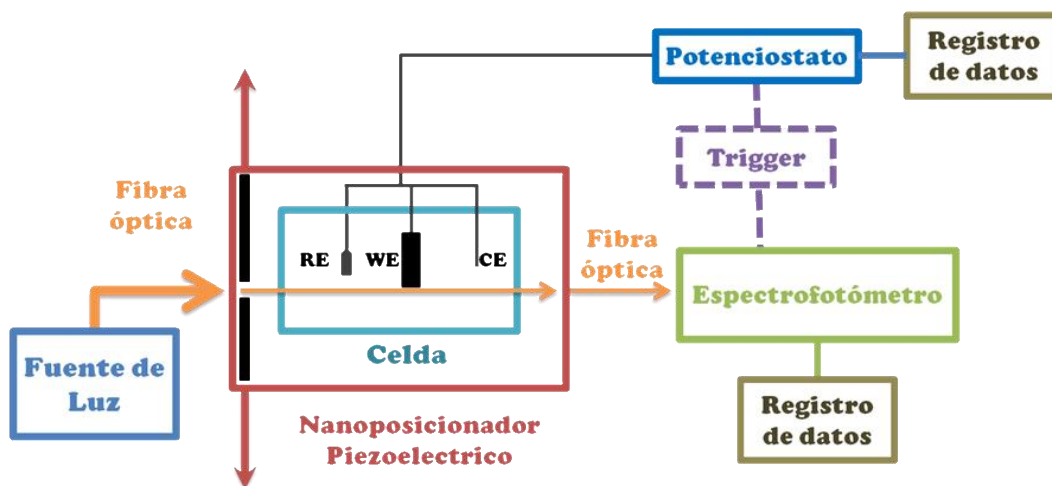


Figura 3.45 Representación esquemática del montaje experimental del dispositivo de rendija móvil para las medidas espectroelectroquímicas de barrido espacial en configuración paralela.

El montaje de la celda se lleva a cabo introduciendo en primer lugar la disolución en el interior de la celda. Posteriormente introducen los electrodos, prestando especial atención al introducir el electrodo de trabajo. Éste debe de quedar situado en el centro de la cubeta, lugar por donde pasa el haz de radiación, y se debe evitar que el electrodo de referencia y, sobre todo, el contraelectrodo se encuentre en esta zona. Si éste último se encuentra cerca, las especies que se pudieran estar formando o transformando en su superficie podrían interferir en las medidas falseando los resultados obtenidos.

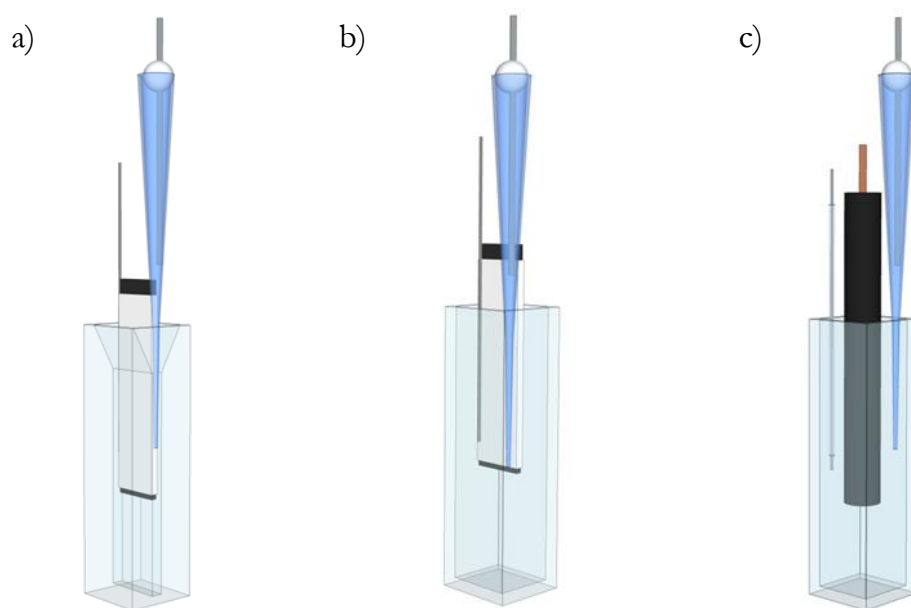


Figura 3.46 Celda espectroelectroquímica para medidas en paralelo a) en capa fina, b) en difusión semi-infinita utilizando una lámina de carbón vitrificado como WE, y c) en difusión semi-infinita utilizando electrodo comercial de carbón vitrificado como WE.

### 3.6.3 Celda espectroelectroquímica bidimensional

Para las medidas espectroelectroquímicas bidimensionales con rendija móvil, el montaje experimental tuvo que modificarse, Figura 3.47. En primer lugar, para que ambas señales espectroscópicas fueran comparables se decidió utilizar la misma fuente de luz, por lo que fue necesaria la incorporación de una fibra bifurcada. De este modo, se divide el haz de luz procedente de la fuente en dos haces incidentes, uno para cada una de las configuraciones espectroscópicas. Una de las ramas de la fibra bifurcada (Figura 3.37.b) se dirige como en los anteriores casos a la lente colimadora que está situada en el soporte fijado al posicionador piezoeléctrico. La otra rama de la fibra bifurcada que conduce el haz de luz emitido por la fuente se conecta a una sonda de reflexión (Figura 3.37.c). La luz emitida por la sonda incide perpendicularmente a la superficie del electrodo, de forma que el haz de luz reflejado es recogido por la misma sonda y

conducido al espectrofotómetro. Ambos espectrofotómetros se sincronizan con el potenciostato mediante un trigger.

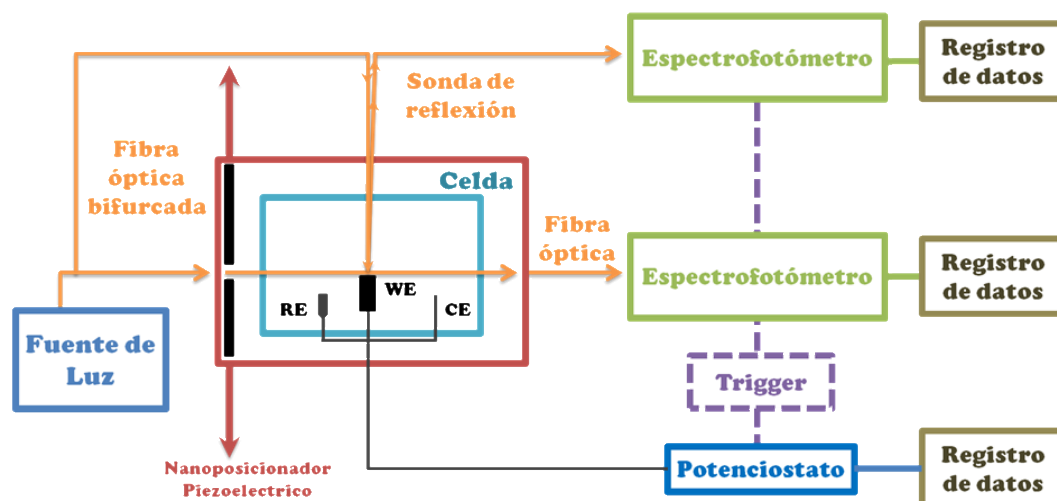


Figura 3.47 Representación esquemática del montaje experimental para medidas de espectroelectroquímica bidimensional con rendija móvil.

La celda espectroelectroquímica, Figura 3.48, está constituida por tres elementos.

1. El cuerpo de la celda se consiguió mediante la modificación de una cubeta espectroscópica, a la que se le eliminó la base y se invirtió la posición.
2. Una pieza de teflón con tres orificios.
3. Un tapón de Sub-seal en la parte superior de la celda para aislar la disolución del exterior.

El montaje de la celda comienza por la introducción del electrodo de trabajo en el orificio de la parte central de la pieza de teflón, garantizando de este modo la planaridad del electrodo de trabajo respecto al haz de radiación en configuración paralela. Además, la pieza de teflón tiene dos orificios de pequeño diámetro en esquinas opuestas para fijar el electrodo de referencia (en el caso de ser un hilo de plata o un microelectrodo de referencia, apartado 3.4.2) y el

contraelectrodo. De este modo se evita que los electrodos interfieran en el camino óptico. Además, la pieza sirve para reducir la cantidad de disolución necesaria. El tapón de Suba-seal permite sellar la celda y minimizar el contacto con el aire, facilitando trabajar en atmósfera inerte. En esta pieza se realizaron cinco orificios. El orificio central, de un tamaño ligeramente mayor se utilizó para la colocación de la sonda de reflexión, el resto de orificios se utilizaron para la colocación del electrodo de referencia, el contraelectrodo, y la entrada y salida de flujo de nitrógeno con el que se consigue la desoxigenación de la disolución. El llenado de la celda se realiza mediante uno de los orificios de la pieza de Suba-seal colocada en la parte superior. Previamente se ha pasado corriente de nitrógeno para eliminar la presencia de oxígeno en la celda. Una vez llenada la celda se continúa con la corriente de nitrógeno para eliminar el posible oxígeno que pueda estar presente en la disolución. Por último, se enfoca la sonda de reflexión sobre la superficie del electrodo de trabajo hasta obtener una buena señal óptica en configuración normal.

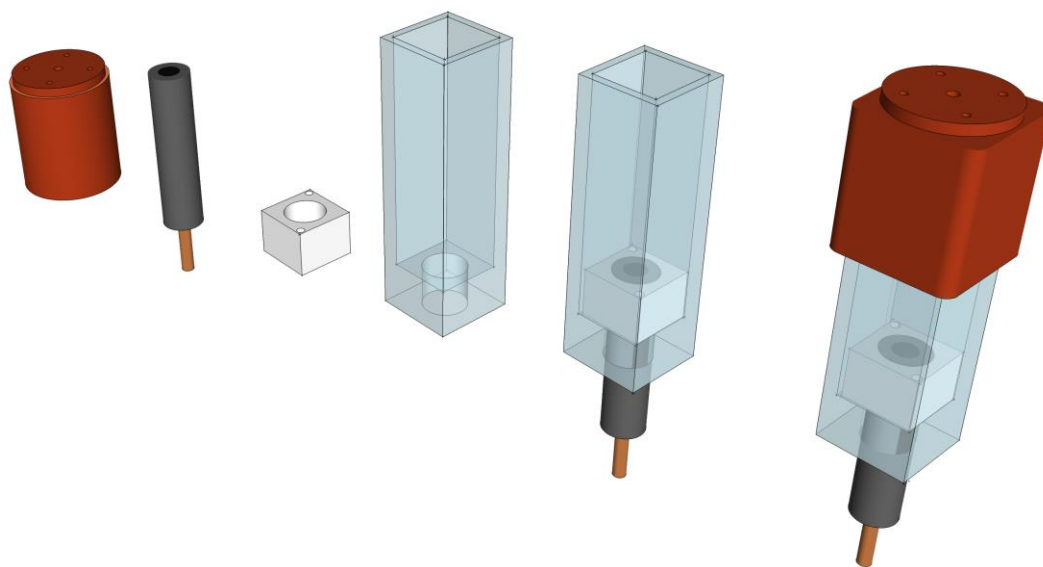


Figura 3.48 Celda espectroelectroquímica para las medidas de Cu-*o*-Va.

Finalmente, el posicionador piezoeléctrico anteriormente descrito en el apartado 3.3.1.4 y empleado para el dispositivo de rendija móvil ha sido utilizado



para controlar la posición de haz de luz respecto a la superficie del electrodo. De esta manera se puede controlar la distancia a la que se sitúa el haz de luz, mejorando además la reproducibilidad de las medidas.

### 3.6.4 Celda espectroelectroquímica de fibra óptica con electrodos de nanotubos de carbono de pared simple transferidos por presión

En esta sección se muestra el desarrollo de un dispositivo experimental que utiliza fibras ópticas adheridas al electrodo de trabajo, para hacer pasar el haz de luz en configuración paralela a través de la disolución adyacente a la superficie de dicho electrodo. El montaje experimental difiere un poco de los anteriores mostrados para trabajar en configuración es en paralelo ya que el diseño de la celda es completamente diferente. En la Figura 3.49 se muestra el esquema de dicho montaje experimental. El electrodo de trabajo utilizado es un electrodo de nanotubos de carbono de pared simple (SWCNT) sobre un soporte de PMMA desarrollado en nuestro grupo de investigación<sup>339</sup>.

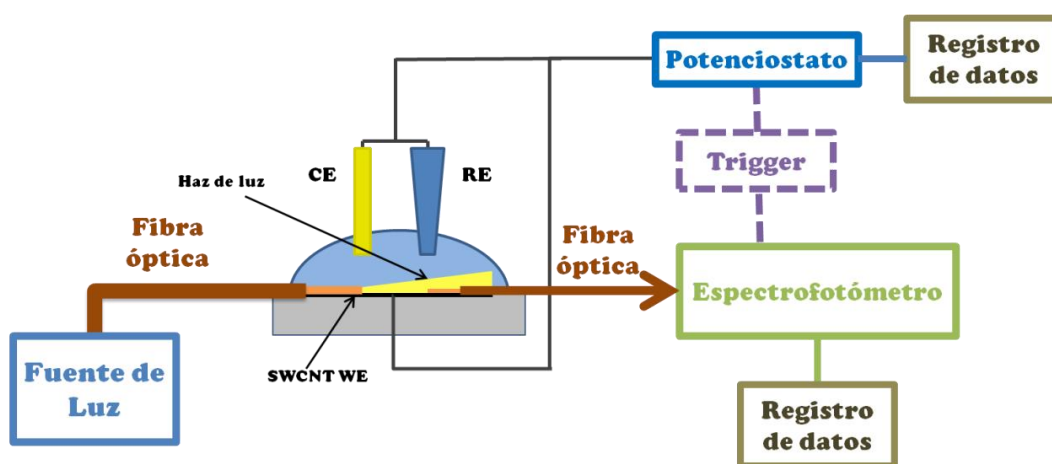


Figura 3.49 Representación esquemática del montaje experimental de la celda de fibras ópticas para trabajar en configuración paralela.

La celda está pensada para realizar experimentos en gota, siendo el volumen de disolución utilizado de 100  $\mu$ l. La celda consta de dos piezas de metacrilato,

colocadas una sobre la otra. La pieza situada en la parte inferior posee un rebaje para situar el electrodo de trabajo de SWCNT. Además se le ha realizado unos microcanales para colocar las fibras ópticas. La otra pieza de metacrilato colocada sobre electrodo de trabajo y las fibras evita el movimiento de éstas durante la experiencia. Esta pieza de PMMA posee un orificio cuadrado en la parte superior para la introducción de la disolución, el electrodo de referencia y el contraelectrodo.

El montaje de la celda (Figura 3.50.a) se inicia introduciendo el electrodo de trabajo en el rebaje de la pieza de PMMA inferior, a continuación se fija en uno de los microcanales de la celda una fibra óptica desnuda, sin película protectora, de 100  $\mu\text{m}$  de diámetro. Esta fibra se coloca sobre la superficie del electrodo de trabajo de SWCNT, y es la encargada de llevar el haz de radiación desde la fuente de luz hasta la disolución adyacente a la superficie del electrodo. Para evitar que se mueva y ayudar a su alineación, se fija esta fibra al microcanal en el que ha sido ubicada. A continuación se coloca a una distancia conocida una segunda fibra óptica de 50  $\mu\text{m}$  de diámetro en otro microcanal de la pieza de PMMA situado en el otro extremo de la celda y alineado con la anterior fibra óptica. De esta forma, después de atravesar la disolución, el haz de luz emitido por la fibra de 100  $\mu\text{m}$  es recogido por la fibra de 50  $\mu\text{m}$  y es transportado por ésta hacia el espectrofotómetro. Una vez alineadas cuidadosamente las dos fibras ópticas con ayuda del microcanal, se fijan los tornillos de la pieza superior de PMMA para asegurar el dispositivo y evitar posibles movimientos de las fibras o del electrodo que pudieran desalinear el sistema óptico. Por último, por el orificio cuadrado de la pieza de PMMA se añade la gota de disolución y se colocan el contraelectrodo y el electrodo de referencia siendo el resultado el que se observa en la Figura 3.50.b.

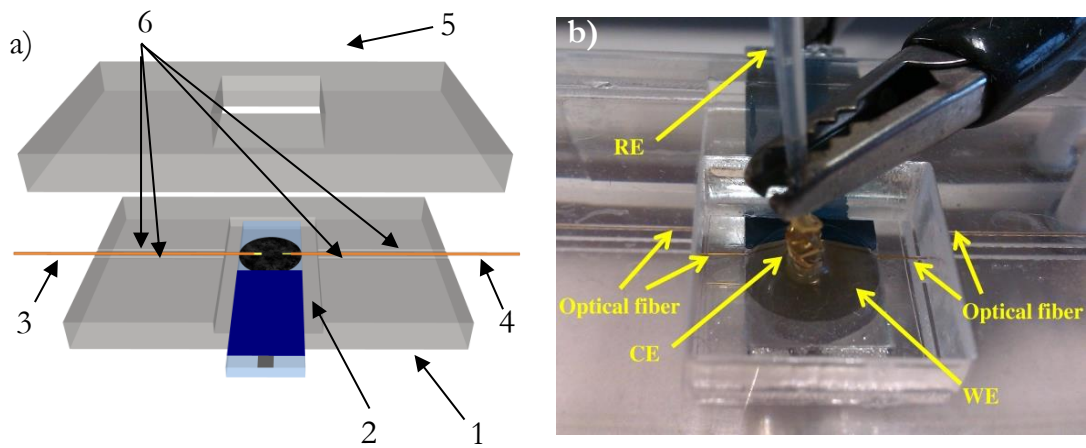


Figura 3.50 a) Esquema del montaje de la celda de fibras ópticas. 1) Pieza de PMMA inferior, 2) electrodo de trabajo de SWCNT, 3) fibra óptica de 100  $\mu\text{m}$ , 4) fibra óptica de 50  $\mu\text{m}$  5) Pieza superior de PMMA, 6) microcanales. B) Fotografía real de la celda ensamblada.



## 4 RESULTS AND DISCUSSION



### ◆ **Objetivos del capítulo**

- Validar y demostrar la funcionalidad de los dispositivos y celdas desarrollados en esta tesis doctoral.
- Aplicar las nuevas configuraciones experimentales desarrolladas a sistemas de interés para la comunidad científica. Para ello hemos realizado el estudio de los procesos de transferencia iónica y electrónica en interfases líquido-líquido de la reducción de la ortovainillina, de la electroquímica del complejo de cobre con ortovainillina como ligando y de la determinación cuantitativa de catecol en presencia de un interferente.
- Demostrar las ventajas de realizar medidas con el nuevo dispositivo de rendija móvil en la denominada espectroelectroquímica de barrido espacial, y con las celdas basadas en fibra óptica útiles en la espectroelectroquímica bidimensional.

### ◆ **Metodología**

- Validación de los dispositivos y celdas espectroelectroquímicas desarrollados utilizando un sistema espectroelectroquímico de referencia.
- Estudios de procesos electroquímicos complejos utilizando los dispositivos espectroelectroquímicos desarrollados, de modo que se obtenga una mayor cantidad de información, que debidamente tratada, permita revelar aspectos de los sistemas estudiados que sean difícilmente comprendidos mediante el uso de únicamente técnicas electroquímicas.

## ◆ Resumen del capítulo

- Este capítulo se encuentra dividido en cuatro bloques, presentando en cada uno de ellos objetivos específicos relacionados con el sistema concreto estudiado, así como el dispositivo específico desarrollado.
- La primera sección de este capítulo demuestra el correcto funcionamiento del dispositivo de rendija móvil mediante el estudio de la transferencia iónica a través de la interfase del catión [tris(2,2'-bipiridina)]rutenio(II). Posteriormente se estudió, también con esta técnica, la síntesis de nanopartículas de paladio en la interfase líquido-líquido, demostrando que es posible generar nanopartículas en esta interfase tan particular. Además, se pudo determinar con precisión el mecanismo de transferencia electrónica que está teniendo lugar durante este proceso de síntesis. Cabe destacar que los clusters de Pd (partículas de Pd de menor tamaño) no solamente quedan retenidos en la interfase, sino que una parte de ellos difunden a en la fase acuosa.
- La segunda sección presenta el estudio del mecanismo de electro-reducción de la molécula de *o*-Va demostrando que es un proceso electroquímicamente irreversible pero químicamente reversible. Además se ha comprobado la capacidad antioxidante de esta molécula cuando el ion superóxido es generado en la disolución de dimetilsulfóxido.
- En la tercera parte se ha utilizado la espectroelectroquímica bidimensional para el estudio del proceso de reducción y oxidación del complejo de cobre (II) con *o*-Va como



ligando. La reducción inicial de este complejo provoca su ruptura y la electrodeposición de Cu(0) en la superficie del electrodo. Sin embargo, la oxidación inicial del ligando permite alcanzar la reducción reversible del complejo a su forma reducida como cobre (I). La espectroelectroquímica bidimensional ha permitido diferenciar inequívocamente los procesos que ocurren en disolución de los procesos superficiales.

- En el cuarto apartado de este capítulo se ha realizado un estudio de detección de catecol con una nueva celda espectroelectroquímica basada en fibras ópticas. El estudio multivariante de los resultados espectroelectroquímicos obtenidos tras una serie de calibración permite determinar catecol cuando se oxida hasta 1,2-benzoquinona. La espectroelectroquímica ha permitido también conocer el mecanismo de reacción de este analito. Además, se ha resuelto una mezcla de catecol e hidroquinona, difícilmente resoluble usando únicamente electroquímicas, pudiendo determinarse la concentración de catecol. Las herramientas quimiométricas utilizadas permiten aprovechar la gran cantidad de información proporcionada por las técnicas espectroelectroquímicas.



## 4.1 Spatial Scanning Spectroelectrochemistry at Liquid/Liquid Interfaces

### 4.1.1 Introduction

Although chemical reduction is the method most commonly used to synthesize metal nanoparticles<sup>340–342</sup>, a number of recent articles have described the use of electrodeposition as a controlled route to nanoparticle preparation<sup>343,344</sup>. Electrodeposition of metals at the interface between two immiscible electrolyte solutions<sup>345–347</sup> combines aspects of the chemical and electrochemical reduction processes. In this interesting approach, a metallic ion present in a liquid phase is reduced to the metal by a reducing agent dissolved in the other immiscible liquid phase. The metal nucleates and grows without any solid support, while the extent and rate of the reduction can be controlled electrochemically through the electrolysis time and the applied potential, respectively<sup>345–347</sup>.

Electrochemical deposition of metal nanoparticles (NPs) at liquid/liquid interfaces can be studied using UV-Vis absorption spectroelectrochemistry. This instrumental technique is useful for the study of complex electrochemical processes<sup>153,226,327,348,349</sup>. Spectroelectrochemistry can be used for sampling both the interface and the adjacent solution. Thus, depending on the incidence direction of the light beam with respect to the interface, UV-Vis absorption spectroelectrochemical measurements can be performed in three main configurations:

- ◆ Normal beam configuration, in which the light beam passes across the L/L interface<sup>350</sup>.
- ◆ Reflection configuration, in which the light beam is reflected from the interface<sup>351–353</sup>.
- ◆ Parallel beam configuration, in which the light beam grazes the interface<sup>354</sup>.

To date, the most widely used configuration in spectroelectrochemistry at the ITIES is the reflection one<sup>351–353</sup>. Here we have used a new UV-visible absorption spectroelectrochemical cell for the study of the electrogeneration of Pd nanoparticles at the water/1,2-DCE interface, based on the parallel incidence of the light beam with respect to the interface (Figura 3.44). The spectroelectrochemical cell is based on a rectangular quartz spectrophotometric cuvette ( $45 \times 12 \times 2$  mm) with a 2 mm light path-length<sup>354</sup>. In this work, we performed spectroelectrochemical measurements in which the position of the light beam with respect to the ITIES was varied with a moving slit controlled by a piezoelectric micropositioner. In such a way we control, with micrometric precision, the exact distance of the light beam with respect to the L/L interface, allowing us to obtain information about the species in the adjacent solution during the reaction at the interface. The capability of varying and controlling the distance of the parallel light beam from the interface gives a noticeable improvement in the spatial resolution of spectroscopic techniques. A simple slit movement allows us to sample either the organic or the aqueous phase in a much easier way than with any other spectroelectrochemical setup. The idea of following the progress of the concentration profiles in a solid electrode/solution interface was developed by McCreery and co-workers<sup>355,356</sup>, who used a laser beam to sample the diffusion layer. In this way they obtained the concentration profiles of species absorbing at the wavelength of the incident laser. Schindler and co-workers<sup>357,358</sup> used a similar setup for studying polymerization processes, also on solid electrodes. In these works, a monochromatic light beam was positioned parallel to the electrode surface and absorbance changes with the distance to the electrode were recorded on a diode array, so that a concentration profile was obtained for each time. More recently, Amatore and co-workers<sup>359</sup> also obtained concentration profiles by using a fiber-optic system and an epifluorescent microscopy detector based on a diode array. The results were limited to fluorescent species. In 2006, Garay and Barbero<sup>360,361</sup> used a piezoelectric positioner to move a laser light in “probe beam deflection”, thereby also obtaining concentration profiles. Gyurcsanyi and Lindner<sup>362</sup> suggested an

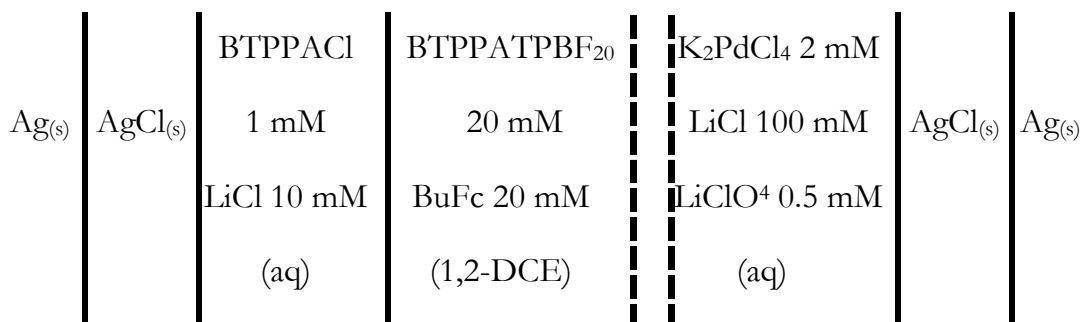
approach based on microscopic measurements to follow changes of the free ionophore concentration across ion-selective membranes. In our work, we have constructed a new device based on a piezoelectric positioner that is used to control and move a slit with respect to the L/L interface; thus, we do not obtain a concentration profile directly but by the evolution of the spectra with time and distance when the interface is sampled by moving the slit at a fixed scan rate. Computer-controlled piezoelectric positioners are commonly used in some analytical techniques such as scanning electrochemical microscopy (SECM). However, to the best of our knowledge, they have not been used in combination with UV-Vis absorption spectroelectrochemical techniques. Combination of the spatial resolution, electrochemical data, and information obtained from molecular absorption spectroscopy can provide useful data on the L/L interfacial process. For these reasons we have called this technique spatial scanning spectroelectrochemistry. We have used the new device to study electrochemical processes at the ITIES in order to illustrate the straightforward alignment of the light beam in L/L spectroelectrochemistry and its suitability to analyze complex electrochemical processes in a single experiment.

#### 4.1.2 *Experimental section*

##### 4.1.2.1 Chemicals

Tris(2,2'-bipyridine)ruthenium chloride,  $\text{Ru}(\text{bpy})_3\text{Cl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (Acros Organics), lithium chloride (Sigma-Aldrich), lithium perchlorate (Merck), butylferrocene (BuFc, Sigma-Aldrich), and potassium tetrachloropalladate(II) (Acros) were analytical grade and used as received without further purification. Bis-(triphenylphosphoranylidene)ammonium tetrakis-(pentafluoro)phenylborate (BTTPA TPBF<sub>20</sub>) was prepared according to a reported metathesis procedure<sup>363</sup> from equimolar amounts of bis(triphenylphosphoranylidene)ammonium chloride (BTTPACl, Lancaster, 97%) and lithium tetrakis-(pentafluoro)phenyl borate (Boulder Scientific, 98%). The L/L interface was formed using water with a resistivity of 18 M $\Omega$  cm (Milli-Q purification system, Millipore, UK), and 1,2-





### 4.1.3 Results and discussion

#### 4.1.3.1 Technique validation.

As one of the goals of this work was to develop a new device for UV–Vis absorption spectroelectrochemical measurements at the ITIES, the performance of the device was evaluated by following the transfer of Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> across the polarized L/L interface. This electrochemical process has been taken as a model in different spectroelectrochemical studies with various configurations.<sup>352–354</sup> The main reason to take Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> as reference system is because it exhibits a well-defined ion transfer at the water|1,2-DCE interface<sup>352</sup> and has a large molar absorption coefficient in water ( $\epsilon_{\text{water}} = 12794 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  at 453 nm, experimental value estimated in our laboratory, in accordance with the reported values<sup>353</sup>). The validation of the new device was performed using cell 1, described above in the experimental section.

In order to compare the response at the two phases, twin chronoamperometric experiments were performed sampling absorption either within the aqueous or the organic phase. In this case, the slit is placed at a fixed position close to the aqueous solution (or the organic one) in such a way that the light beam passes parallel and adjacent to the interface. In both cases a potential of +0.38 V was applied for 40 s and UV-Vis absorption spectra were measured during the potential step. Absorbance at a fixed position (adjacent to the interface) and recorded *versus* time in the two independent experiments is plotted

in Figure 4.1.a. As can be observed, the evolution of the spectra in the two phases is almost a mirror image.

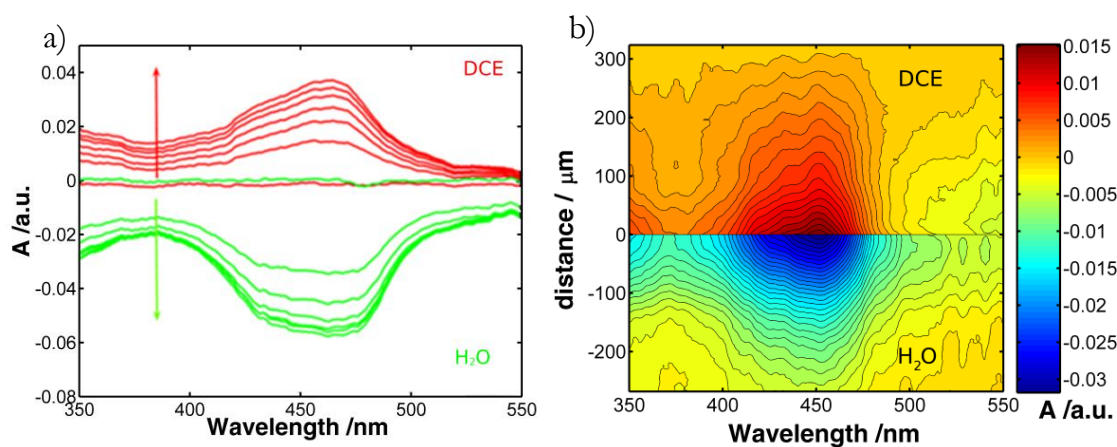


Figure 4.1 Chronoabsorptometric experiments by applying +0.38 V to Cell 1 for 40 s. a) Spectra recorded during two separate chronoamperometric experiments, sampling the aqueous phase (green) and the organic phase (red); b) Spectra recorded in a single experiment while the slit is being moved from the aqueous solution to the organic phase at  $50 \mu\text{m s}^{-1}$ . The positive distances denote the distance along the interface normal in the organic phase, the negative values correspond to the aqueous phase.

There is no significant shift of the  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  absorption band due to the solvent, an observation consistent with the ease transfer of this ion. The absorbance band around 453nm corresponding to  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  decreases when the light beam passes, sampling the aqueous phase, while, on the contrary, it increases when it is sampling the organic one. This shows that we can precisely place the light beam very close to the interface with our device. The precise position of the slit is easily obtained, when the light beam passes through the two interfaces a marked change in absorbance is observed because of the different optical properties of the two solvents. When the light beam is placed adjacent to the interface and it is moved toward the bulk solution, if no electrochemical reaction takes place there is no change of absorbance.

However, all the information related to the ion transfer can be extracted in a single experiment if the light beam is spatially scanned from the aqueous phase to the organic one during the experiment. The slit was placed 1 mm away from



the interface and was moved from the aqueous phase to the organic one. A potential of +0.38 V was applied for 40 s, and the slit movement at  $50 \mu\text{m s}^{-1}$  was initiated when the potential was applied. Figure 4.1.b shows, as a contour plot, the spectra recorded with respect to distance from the interface during a chronoamperometric experiment. Only the distances close to the interface ( $<300 \mu\text{m}$ ) have been plotted to show better the concentration gradient in the two solutions. In this case, the distance in the aqueous phase is defined with respect to the organic interface. Taking into account the width of the slit, we assume that zero position is set when the light beam is adjacent to the organic phase. When the light beam passes into the organic phase, there is an interval time in which the light beam is sampling both phases and no analytical information can be readily obtained. We take as zero position in the organic phase when the light beam is adjacent to the aqueous interface and only samples the organic phase. Distance in the organic phase is therefore calculated with respects to the aqueous one. A diagram describing how the distance is calculated is shown in Figure 4.2 Again the decrease of the absorbance in the aqueous phase is concomitant with the increment of absorbance in the organic phase showing the ion transfer of  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  across the interface due to the difference of potential applied between the two immiscible solutions.

The diffusion coefficient of  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  in the aqueous phase was calculated from the data obtained in an experiment with the slit placed in a fixed position, in such a way that the light beam passes parallel and adjacent to the interface and samples the aqueous phase. Experimental data recorded during the chronoabsorptiometric experiments were fitted to the model described previously by our group<sup>354</sup>. A value of  $3.29 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$  was obtained from the electrical charge and a value of  $3.65 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$  was obtained from the absorbance at 453 nm. The diffusion coefficient of  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  was also assessed by moving the slit from 1 mm away toward the interface at  $50 \mu\text{m s}^{-1}$ , sampling the aqueous solution. In this case, experimental data are fitted to a model based on a digital simulation of the process<sup>364</sup> assuming that ion transfer is controlled

by diffusion. The light beam goes through the diffusion layer in a direction parallel to the interface. The absorbance is given by the Ecuación 3.5. Concentration profiles can be easily calculated for each time<sup>364</sup> and therefore, using the discretized form<sup>364</sup> of Ecuación 3.5, we can calculate the theoretical absorbance for each distance (time). Functions for the calculations were written in Matlab and used for curve-fitting analyses.

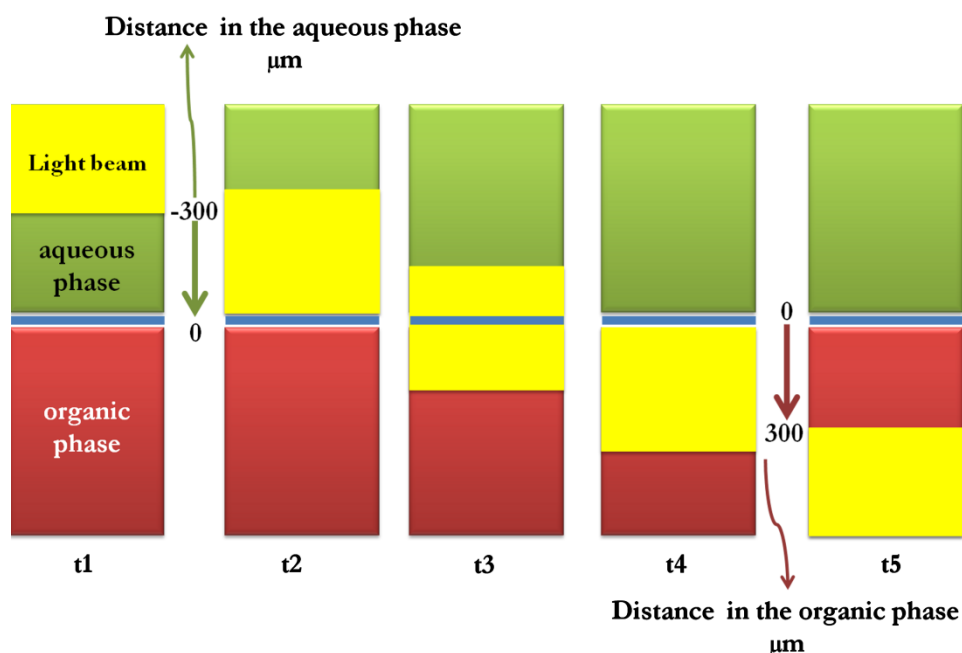


Figure 4.2 Diagram showing how the slit position is calculated during the experiments. t1 is the initial position, in this example 300 μm away from the interface in the aqueous phase. At t2 the slit is at zero position in the aqueous phase, adjacent to the interface. At t3 the slit is sampling both phases. At t4 the slit is at zero position in the organic phase, adjacent to the interface. t5) is the final position, in this example, 300 μm from the interface

A value of  $3.70 \times 10^{-6} \text{ cm}^2$  was obtained by fitting simulated data to experimental signal of absorbance at 453 nm (Figure 4.3). The agreement between these values and the ones found in the literature<sup>365,366</sup> (from  $3.0 \times 10^{-6}$  to  $4.8 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ ) demonstrates the validity of this approach.

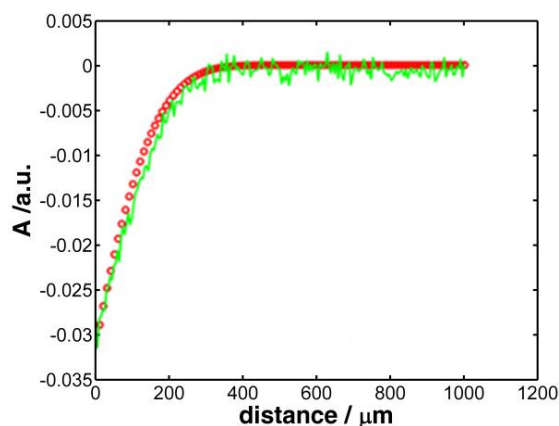
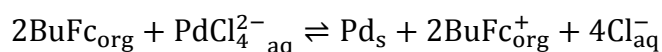


Figure 4.3 Theoretical signal (circles) and experimental signal (solid line) obtained during a chronoabsorptometric experiment, by applying +0.38 V for 20 s and moving the slit from 1 mm away towards the interface at  $50 \mu\text{m s}^{-1}$ . Absorbance taken at 453 nm.

#### 4.1.3.2 Electrodeposition of Pd Nanoparticles at the Interface.

The electrodeposition of palladium NPs at the L/L interface occurs as a consequence of the heterogeneous electron transfer between the aqueous phase tetrachloropalladate(II) anion and the organic phase electron donor, butylferrocene (BuFc), following the reaction<sup>346,347,367</sup>:



This reaction can be controlled by the potential difference between the aqueous and the organic phase (1,2-DCE). When the potential difference is enough to cause the butylferrocene oxidation, the associated reduction of aqueous phase tetrachloropalladate(II) anion yields metal nanoparticles in the interface and butylferricinium cation ( $\text{BuFc}^+$ ) in the organic phase. Cell 2, mentioned above, was used to study this process.

To obtain comparative results it was deemed important to compensate the solution phase resistance and the reference electrode drift, frequently observed when using low polarity solvents such as 1,2-DCE. Perchlorate ion was added to the aqueous solution as an internal reference to perform the resistance compensation. This anion does not react with palladium species<sup>368</sup> and its

interfacial transfer occurred at a potential where no deposition was observed<sup>345</sup>. In this way, a precisely controlled overpotential can be applied<sup>345</sup>.

It is important to emphasize that the acquisition of spectroscopic data can be performed over a wide UV-Vis spectra range, from which we can select the most representative wavelength of the process. The absorbance maximum for aqueous phase tetrachloropalladate(II) is observed at 453 nm (Figure 4.4). Therefore, Pd nanoparticles synthesis can be followed selecting this wavelength.

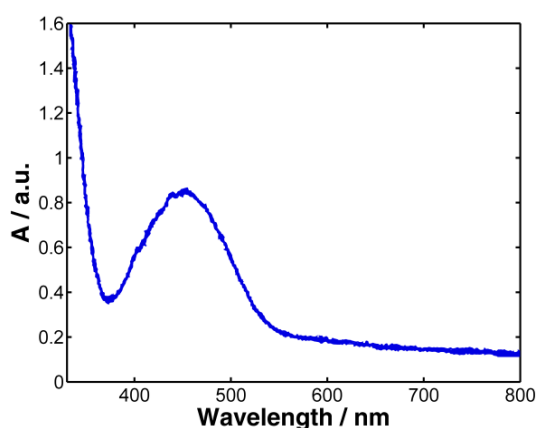


Figure 4.4 Tetrachloropalladate(II) spectrum in aqueous solution

Figure 4.5.a shows the voltabsorptogram at 453 nm obtained during a cyclic voltammetric scan between 0.00 V and +1.00 V at 0.01 Vs<sup>-1</sup>. The slit was placed in a fixed position, allowing the light beam to pass close to the interface in the aqueous phase. Changes in absorbance are related to the electrochemical reaction taking place during the potential scan.

As shown in Figure 4.5.a, when the aqueous phase is positively polarized with respect to the organic one, a decrease in absorbance from +0.40 V onward is observed, which is attributed to depletion of tetrachloropalladate(II). During the backward scan, the concentration of Pd(II) complex continues decreasing until reaching +0.55 V. From that potential onward is observed.

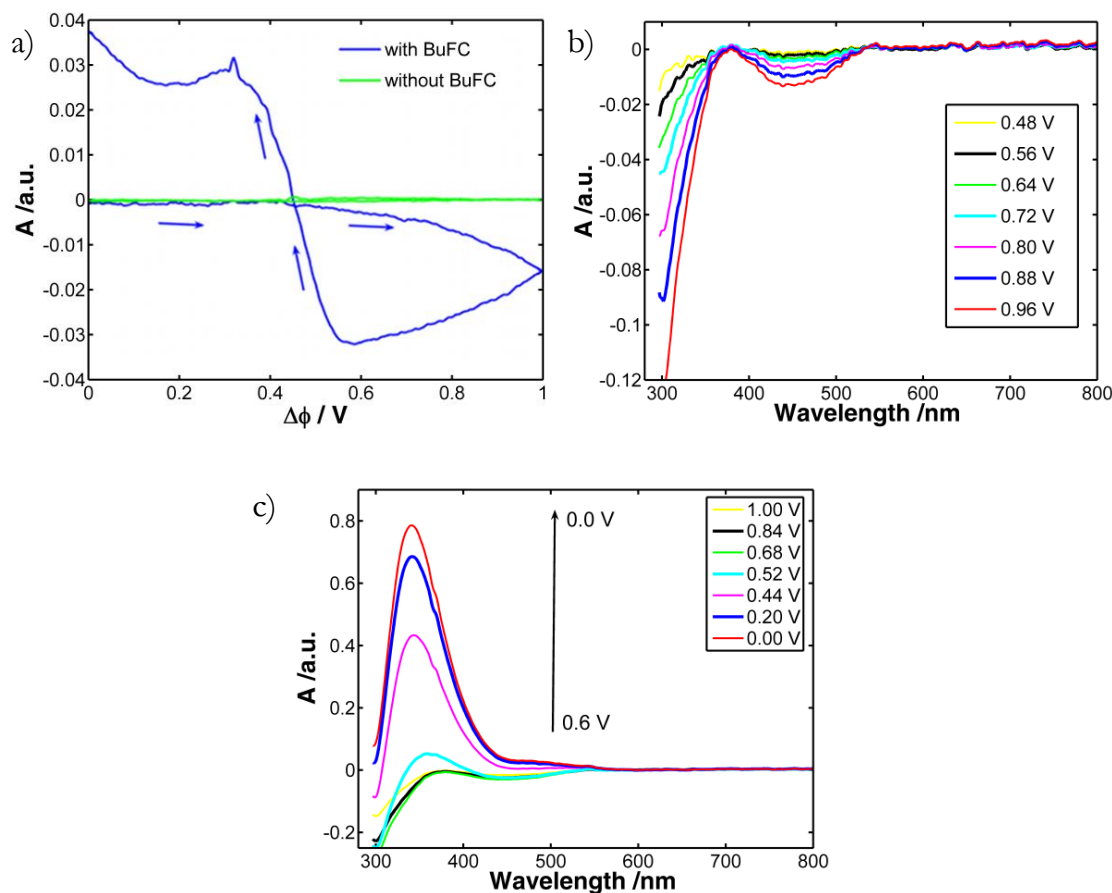


Figure 4.5 Voltabsorptometric experiment performed by scanning Cell 2 between 0.00 V and +1.00 V at  $0.01 \text{ V s}^{-1}$ , placing the slit in a fixed position in the aqueous phase close to interface. a) Voltabsorptogram at 453 nm obtained during the cyclic voltammetry and the same response in the absence of  $\text{PdCl}_4^{2-}$  in Cell 2. b) Spectra recorded during the forward scan. c) Spectra recorded during the backward scan.

The evolution of the spectra during the forward and backward scans gives a more detailed picture of the chemical reactions taking place at and near the interface. Figure 4.5.b shows the spectra obtained at the aqueous side of the ITIES during the forward scan. As can be seen, a decrease in absorbance around 453 nm corresponding to the depletion of tetrachloropalladate(II) at the L/L interface takes place. It is noteworthy that it is not expected the ion transfer of this anion in the potential range investigated here<sup>367</sup>. In fact, we did not observe ion transfer when the experiment is performed in the absence of BuFc in cell 2 (Figure 4.5.a). In contrast, on the backward scan (Figure 4.5.c) we can see a strong increase of absorbance at shorter wavelengths that cannot be related to

the regeneration of the original species but to another compound with a completely different spectrum. A band centered at 350 nm is observed with an absorbance 1 order of magnitude larger than that of the initial cell contents. The spectrum of Pd cluster generated by radiolysis<sup>369</sup> is in full accordance with this spectrum registered in the backward scan. Henglein and Michaelis observed absorption bands in the range between 300 and 400 nm, corresponding to colloids with a broad size distribution ranging between 1 and 4 nm. Therefore, we can deduce that the species observe during the backward potential scan are palladium cluster.

To understand better the electrochemical reaction at the interface, the same experiments were repeated but observing this time the organic phase. Figure 4.6 shows (a) the voltabsorptogram at 300 nm, (b) the spectra obtained in the forward potential scan, and (c) in the backward scan. In a general overview, a maximum absorption peak around 300 nm and a broader band centered at 620 nm can be noticed, these bands are characteristic of the butylferricinium cation, Figure 4.7, that shows the evolution of the spectra of the couple BuFc/BuFc<sup>+</sup> during a spectroelectrochemical experiment on a Pt solid electrode. Therefore, from the complete coincidence of the spectra recorded in the L/L experiment and in the solid/liquid experiment, we can conclude that the compound generated during the forward scan and at the beginning of the backward scan is BuFc<sup>+</sup> and no spectral evidence of PdCl<sub>4</sub><sup>2-</sup> transfer is observed (Figure 4.6). When the potential is reversed, the spectra slightly decrease due to the diffusion of BuFc<sup>+</sup> to the bulk solution, (Figure 4.6.c).

Absorbance changes are more clearly seen by plotting the absorbance at 300 nm versus the potential difference between the two immiscible phases (Figure 4.6.a). The voltabsorptiogram in the absence of PdCl<sub>4</sub><sup>2-</sup> is also shown in Figure 4.6.a and it confirms that no BuFc<sup>+</sup> is formed in that case.

The voltabsorptiogram in the presence of PdCl<sub>4</sub><sup>2-</sup> shows the increase in absorbance during the forward scan and during the backward scan up to a potential of +0.80 V. During the backward scan, from +0.60 V to more negative

potentials, BuFc<sup>+</sup> absorbance decreases slightly because of diffusion to the bulk solution and, contrary to the response of the aqueous solution, no increase of absorbance is observed. Therefore, we can conclude that Pd clusters are only observed in the aqueous phase; these clusters have been generated electrochemically at the interface but then desorbed into the aqueous bulk. This desorption process is preferential toward the aqueous solution and seems not to take place toward the organic solution.

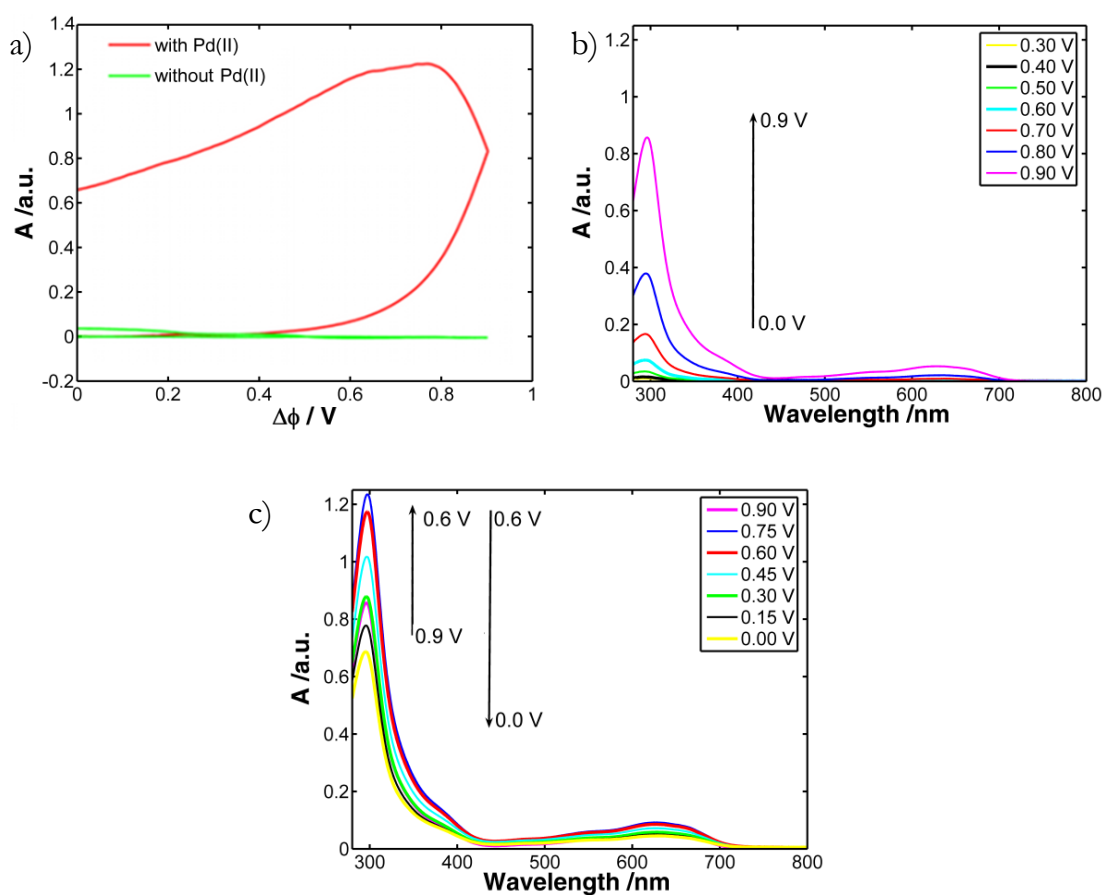


Figure 4.6 Voltabsorptometric experiment performed by scanning Cell 2 between 0.00 V and +0.90 V at 0.01 V s<sup>-1</sup>, placing the slit in a fixed position of the organic phase close to interface. a) Voltabsorptogram at 300 nm obtained during a cyclic voltammetry and the same response in the absence of BuFc in Cell 2. b) Spectra recorded during the forward scan. c) Spectra recorded during the backward scan.

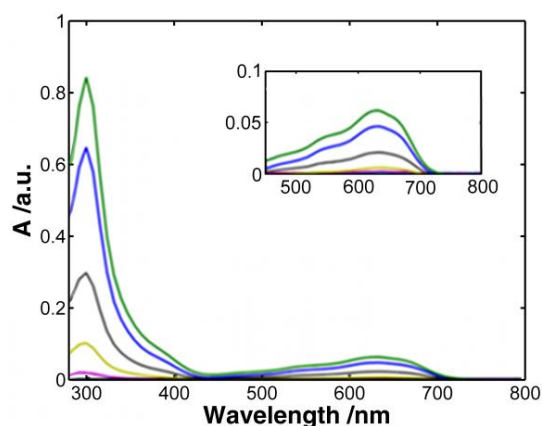


Figure 4.7 Evolution of butylferricinium cation spectra recorded during a voltammetry using a solid Pt working electrode, by scanning the electrode potential between 0.00 V and +0.90 V at  $0.10 \text{ V s}^{-1}$  in a 20 mM BuFc and 20 mM BTPPATPBF<sub>20</sub> 1,2-DCE solution. Initial solution was taken as reference spectra. Absorbance increases with potential.

Next, we studied the electrosynthesis of Pd NPs by chronoamperometry, applying +0.50 V beyond the perchlorate reverse peak (taken as an internal reference) for 180 s. When the slit is placed in a fixed position, close to the interface in such a way that the light beam passes parallel and adjacent to the interface sampling the aqueous phase, a decrease of absorbance at wavelengths related to the Pd clusters were observed (Figure 4.8.a), as in the potentiodynamic experiments. Therefore, during the chronoamperometry, the reduction of the anion in the aqueous phase in the vicinity of the interface results in generation of both interfacial Pd nanoparticles and soluble Pd clusters. As adsorption energy depends on particle area, it should lead to size segregation, with smaller particles displaced from the interface by longer ones<sup>370</sup>.

Figure 4.9 compares the evolution of absorbance at 320 nm and 450 nm related to the concentration of PdCl<sub>4</sub><sup>2-</sup>, and the evolution of the absorbance at 370 nm, corresponding to the generation of palladium clusters. As can be seen, there is a clear contribution to the absorption spectra of cluster, especially for longer times, demonstrating that during the reduction of PdCl<sub>4</sub><sup>2-</sup>, Pd nanoparticles are formed not only at the interface, but also as soluble clusters that diffuse into the bulk solution.



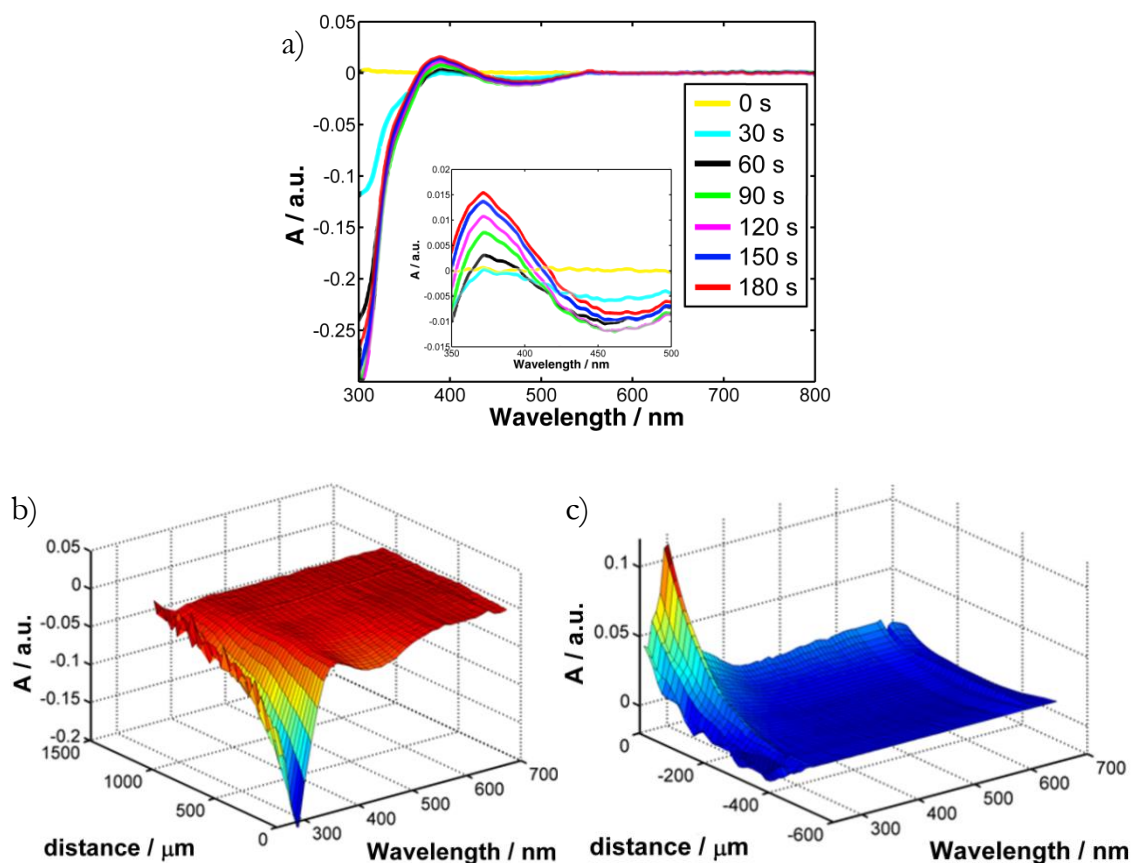


Figure 4.8 Chronoamperometric experiments applying +0.50 V beyond the perchlorate reverse peak to cell 2 for 180s. a) Spectra recorded sampling the aqueous phase at different times. Inset: Zoom of the spectral region where the clusters absorb. Spectra recorded in a single experiment while the slit is being moved at  $31 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ , b) from the aqueous solution to the interface, and c) from the interface to the organic phase.

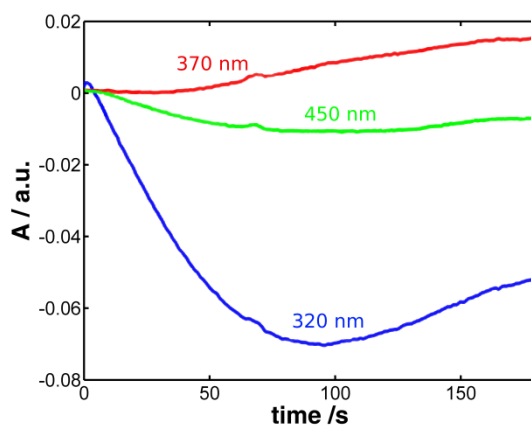


Figure 4.9 Evolution of the absorbance with time at 320, 370 and 450 nm during a chronoamperometry experiment, applying + 0.5 V beyond the perchlorate reverse peak for 180 seconds.

To illustrate the spatial nature of the nature of the spectral response, the same experiment was performed while scanning the slit in the space from the aqueous solution close to the interface to the organic phase. The spectra obtained during the scan are plotted in Figure 4.8.b and Figure 4.8.c. the signal obtained in the organic phase corresponds to generation of butylferricinium, whose concentration decreases as the beam is moved away from the interface. Likewise, a gradient with distance is observed for the absorbance changes in the aqueous phase related to the reduction of  $\text{PdCl}_4^{2-}$  (bands around 320 and 450 nm diminish with time) and the generation of Pd clusters (band around 370 nm increase with the time). The spatial spectroscopic response confirms that:

1. The reduction of the Pd complex takes place with simultaneous oxidation of butylferrocene
2. The metallic Pd NPs and clusters generated are deposited not only at the interface but also diffuse into the aqueous solution.

The existence of these clusters of Pd has been verified in previous studies performed in the research group<sup>371</sup>, in which, transmission electron microscopy analysis was performed to understand the morphology of the colloidal palladium particles generated. In that study it was observed that samples collected from the solution close to the interface in the aqueous phase after a chronoamperometric experiment for long time (900 s) shows the presence of clusters with an average diameter of  $1.49 \pm 0.36$  nm.

It was also observed that Pd NPs deposited at +0.5 V beyond the perchlorate reverse peak are composed of aggregates of smaller particles, that have desorbed from the interface, and the size of the Pd nanoparticles that form aggregates varies slightly with the applied overpotential, being bigger as bigger is the applied overpotential.

This conclusion is consistent with previous studies of nanoparticles adsorption at the liquid-liquid interface, which have shown that the dependence

of adsorption energy on particle area leads to size segregation, where smaller particles are displaced from the interface by larger ones<sup>370</sup>.

#### 4.1.4 *Conclusions*

A new analytical device has been developed that allows us the study of chemical processes taking place when a potential difference is applied to a L/L interface. A single experiment allows us to observe not only ion transfer across a polarized ITIES but also electron transfer between compounds through the L/L interface. This technique is denoted as spatial scanning spectroelectrochemistry.

The technique has been successfully validate using the transfer of  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  through the water/1,2DCE interface as model system. This technique has then been applied to follow the electrodepositon of Pd NPs.  $\text{PdCl}_4^{2-}$  concentration in the aqueous phase decreases simultaneously with the concentration of n-butylferrocene in the organic phase. It enabled us to observe the formation of Pd nanoparticles, which are deposited at the L/L interface, and small Pd clusters that desorb and are found in the aqueous phase. These soluble clusters are displaced from the interface during the reduction of  $\text{PdCl}_4^{2-}$ . The Pd reduction process is irreversible under the conditions investigated in this thesis.



## 4.2 Spatial Scanning Spectroelectrochemistry at solid/liquid interfaces.

### 4.2.1 Introduction

Spectroelectrochemistry can be defined as an instrumental technique that combines *in-situ* spectroscopic and electrochemical measurements obtained during a chemical process. Most times, the chemical reaction is electrochemically controlled, using the optical signal to obtain molecular information about the chemical process. Among the different possible experimental set-ups, UV-Vis absorption spectroelectrochemistry has been widely used for decades for a better understanding of complex mechanisms of reaction in inorganic<sup>303,307,372,373</sup>, organic<sup>317,374,375</sup> and biochemical<sup>163,320,376–378</sup> systems. For this purpose, a number of spectroelectrochemical cells have been developed<sup>305,308,311,327,328,338,379</sup>. The two main experimental arrangements of the working electrode respect to the light beam consist of the measurement of the intensity attenuation of a light beam that passes: 1) normal or 2) parallel to the electrode surface. Normal arrangement can only be proposed either for optically transparent electrodes which are limited to only few transparent conductive materials or for a reflection configuration. However, parallel arrangement measurements can be performed with any kind of material as electrode. Besides, this second arrangement is also very advantageous because the optical pathway, equal to the length of the working electrode, is dramatically higher compared to that in normal configuration, equivalent to the length of the diffusion layer. Moreover, the combination of spectroelectrochemistry with piezoelectric positioners, named as spatial scanning spectroelectrochemistry, can be used to sample the solution adjacent to the electrode at controlled distances in such a way that the evolution of the concentration can be measured not only with time but also with distance from the electrode. In previous section, this approach has demonstrated to be extremely useful to sample the two different phases during a L/L electrochemistry experiment. Here, we extend the usefulness of spatial scanning spectroelectrochemistry, using a similar set-up, to the study of the spectra evolution at different distances from electrode surface during electrochemical

experiments carried out at a solid electrode. The new spectroelectrochemical device works as a long-optical pathway cell in parallel arrangement (Figura 3.45).

First, we have used *o*-tolidine, usually employed as reference system in spectroelectrochemistry, to validate our long-optical pathway spectroelectrochemical cell. Next, the validated set-up has been used to study the electrochemical mechanism of reaction of *o*-vanillin (2-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde, *o*-Va) that is a positional isomer of vanillin (4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde), a plant natural product used as food flavoring agent with known therapeutic activities<sup>101</sup>. The two species have antioxidant properties at milli-molar concentrations<sup>100</sup>, being *o*-Va a more effective free-radical quencher than vanillin at concentrations up to 10 mM. More recently, it has been demonstrated that the redox activity of hydroxylbenzaldehydes makes them suitable as chemosensitizers, enhancing the activity of antifungal agents, being *o*-Va one of the most effective<sup>99</sup>. Additionally, *o*-Va has been employed as ligand for transition metals, forming stable complexes with therapeutic potential, mainly involved in redox or electron-transfer processes<sup>380,381</sup>. Regarding these properties, the investigation of the redox behavior of *o*-Va has special interest. The electrochemical characterization by cyclic voltammetry of this compound is included in the study of its copper complex<sup>382</sup>. Other authors have analyzed the electrochemical properties<sup>383</sup> and the catalyzed redox oligomerization reactions<sup>384</sup> of the vanillin isomer in aqueous media. Due to its potential therapeutic applications, the behavior of *o*-Va in dimethylsulfoxide solution is relevant because this is the solvent commonly used for biological assays.

## 4.2.2 *Experimental section*

### 4.2.2.1 Chemicals

*o*-Tolidine (Sigma-Aldrich), *o*-vanillin (Sigma-Aldrich), tetrabutylammonium hexafluorophosphate (TBAPF<sub>6</sub>, Merck), dimethylsulfoxide

(DMSO, Fischer Chemical), acetic acid (Acros) and perchloric acid (Acros) were analytical grade and were used as received without further purification. Water with a resistivity of  $18\text{M}\Omega\text{ cm}$  (Milli-Q purification system, Millipore), was used to prepare aqueous solutions. For safety considerations, all handling and processing were performed carefully.

#### 4.2.2.2 Instrumentation

The new spectroelectrochemical cell (Figura 3.46), developed to measure in parallel arrangement using a mobile slit, is based on the one previously described for L/L measurements in section 3.6.1. In this work, a solid electrode substitutes one of the liquid phases:

Spectroelectrochemical experiments were carried out using a PGSTAT 302N potentiostat, mentioned in section 3.3.1.5, coupled to a QE65000 Spectrometer (section 3.3.1.3). The light beam, supplied by a DH-2000 Deuterium-halogen light source (section 3.3.1.1), was guided to, and collected from, the spectroelectrochemical cell by  $230\text{-}\mu\text{m}$  diameter optical fibers (section 3.3.1.2). The three-electrode system consists of a flat glassy carbon working electrode, an Ag/AgCl/3M KCl reference electrode, section 3.4.2, and a platinum wire auxiliary electrode.

#### 4.2.2.3 Computational methods

The geometry of all the species under study were optimized using the Becke's three parameters hybrid density functional<sup>385</sup> with the gradient-corrected correlation functional due to Lee, Yang, and Parr<sup>386</sup> a combination that gives rise to the well-known B3LYP method. The cc-pVTZ<sup>387</sup> basis set was used for H and C, whereas the aug-cc-pVTZ<sup>387,388</sup> basis set was utilized for O.

In order to facilitate the comparison of theoretical results with experimental data, geometry optimizations and calculation of properties are performed including solvent effects (DMSO) through the Polarizable Continuum Model<sup>389,390</sup>.

The Hessian matrix of the total energy with respect to the nuclear coordinates of every molecule was calculated at the same level of theory and was diagonalized to verify whether they are local minima or saddle points on the corresponding potential energy surfaces.

The electronic spectra of all the species in DMSO were calculated using the time dependent density functional theory (DFT)<sup>391</sup>.

All the calculations were carried out with the Gaussian 03 package<sup>392</sup>.

#### 4.2.3 *Validation of the experimental set-up*

One of the goals of this work was to develop a new UV-Visible absorption long optical pathway spectroelectrochemical cell (Figura 3.46) coupled with a spatial scanning spectroelectrochemical device (Figura 3.45). This new device was evaluated with *o*-tolidine, widely used as a model in spectroelectrochemistry<sup>319,322,323,338,393</sup> because it exhibits a fast and reversible two electron transfer and has a large molar absorption coefficient in water,  $\epsilon = 60670 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  at 438 nm<sup>327</sup>.

Figure 4.10 shows the spectroelectrochemical signals recorded during a cyclic voltammetric experiment, scanning the potential between +0.50 and +0.80 V at  $0.005 \text{ V s}^{-1}$ , in a  $10^{-4} \text{ M}$  *o*-tolidine solution with 1 M perchloric acid and 0.5 M acetic acid as supporting electrolyte. In this first experiment, the light beam goes through the solution sampling the solution adjacent to the electrode without moving the light beam away from the electrode surface. Therefore, the distance between the light beam and the electrode surface can be considered as zero. As was expected, the voltammogram (Figure 4.10.a) shows the reversible 2-electron transfer of the *o*-tolidine/*o*-tolidinium cation couple. Figure 4.10.b shows the evolution of corresponding spectra registered during this experiment. As can be seen, the 3-D plot displays spectral information about the chemical system; that is, *o*-tolidine is oxidized to the absorbent *o*-tolidinium cation with a maximum of absorbance centered at 438 nm, cation that is subsequently reduced when the potential is scanned back to the initial value. Figure 4.10.c shows the



voltabsorptogram at the wavelength of the maximum absorbance, 438 nm. The pertinent increase of absorbance during the anodic scan and the later decrease in the cathodic scan is observed. The total concordance between the experimental responses and the expected ones described elsewhere<sup>364</sup> proves the correct performance of the new long-optical pathway cell when the slit is placed in a fixed position with the light beam passing parallel and adjacent to the electrode.

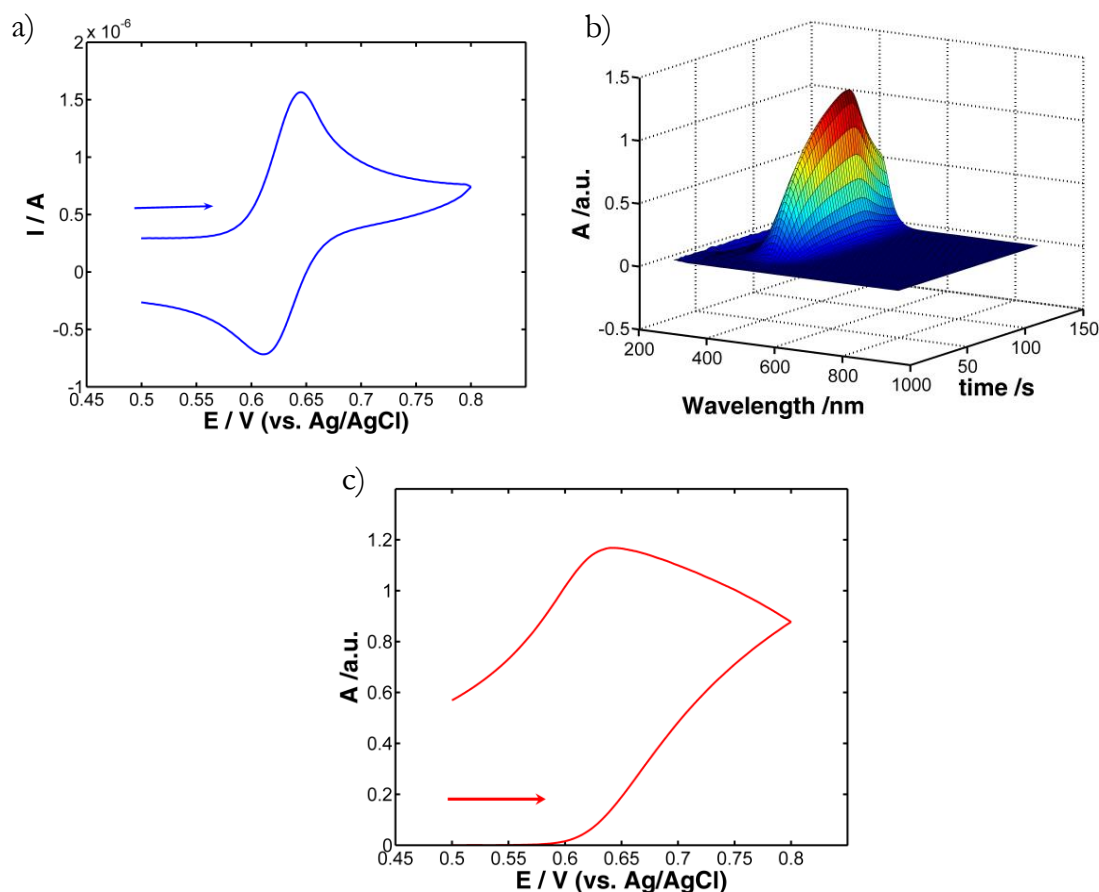


Figure 4.10 Spectroelectrochemistry signals obtained in  $10^{-4}$  M *o*-tolidine/ $0.5\text{M CH}_3\text{COOH}$  and  $1\text{M HClO}_4$  solution during a cyclic voltammetric experiment between  $+0.50$  and  $+0.80$  V at  $0.005\text{ V s}^{-1}$ . (a) Cyclic voltammogram, (b) 3D plot absorbance/potential (time)/wavelength, and (c) voltabsorptogram at 438 nm.

In order to obtain spatial information about the products generated during the *o*-tolidine oxidation, a chronoamperometric experiment was performed sampling the absorbance spectra at different distances from the electrode surface. In this case, the collimated light beam is moved from  $1100\ \mu\text{m}$  away from the

electrode surface toward the electrode surface at a rate of  $15 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ . A potential of  $+0.80 \text{ V}$  was applied for  $75 \text{ s}$  and UV-Vis absorption spectra were simultaneously registered during the potential step.

Figure 4.11 shows the spectra recorded at different distances from the electrode surface during the experiment. As can be observed, an absorbance band around  $438 \text{ nm}$ , corresponding to *o*-tolidinium cation, evolves when the light beam samples the solution closer to the electrode. The absorbance decreases when the light beam moves away from the electrode surface. When the light beam is far enough, out of the diffusion layer, no absorbance bands are appreciated. This result reproduces the spatial distribution of *o*-tolidinium cation along the diffusion layer.

Thus, we have demonstrated that using this new device we can precisely control the position of the light beam respect to the electrode surface. When the light beam is placed in the bulk solution there is no change of absorbance, but when it is near to the electrode surface, information related to the spatial distribution of the products generated and/or consumed on the electrode can be obtained, in this case only the generation of the single absorbent species in solution, *o*-tolidinium cation, is observed.

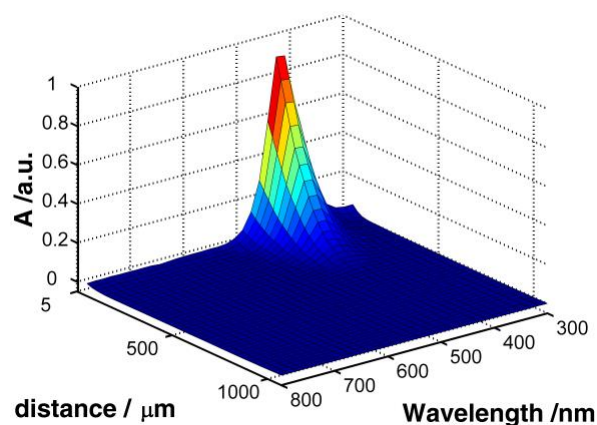


Figure 4.11 3D plot absorbance/wavelength/distance from the electrode surface obtained during a chronoamperometric experiment at  $+0.80 \text{ V}$  during  $75 \text{ s}$  in  $10^{-4} \text{ M}$  *o*-tolidine /  $0.5 \text{ M}$   $\text{CH}_3\text{COOH}$  and  $1 \text{ M}$   $\text{HClO}_4$  solution. Slit scan rate of  $15 \mu\text{m s}^{-1}$ .

#### 4.2.4 Study of *o*-Vanillin electroreduction mechanism

Once we have shown the good performance of the new cell using a reference system, we have used the new device to study the electrochemical reduction of *o*-Va in presence and absence of oxygen. This electrochemical process is a good example to show the utility of spectroelectrochemistry and, in particular, the usefulness of spatial scanning spectroelectrochemistry in parallel configuration, in order to understand the mechanisms of reaction.

For this purpose, we have started this study performing different cyclic voltammetry experiments fixing the position of the light beam close to the electrode surface. Initially, the potential was scanned in the cathodic direction to observe the reduction of *o*-Va, trying to shed more light on the products generated during this electrochemical process. Figure 4.12 shows the spectroelectrochemistry responses obtained for a cyclic voltammetry experiment where the potential was scanned at  $0.01 \text{ V s}^{-1}$  from  $0.00 \text{ V}$  to  $-0.90 \text{ V}$  in a  $10^{-4} \text{ M}$  *o*-Va solution with  $0.1 \text{ M}$  TBAPF<sub>6</sub> as supporting electrolyte using dimethylsulfoxide as solvent. The solution was deoxygenated with nitrogen for 5 minutes before starting the experiment. Figure 4.12.a shows the voltammogram registered during this spectroelectrochemistry experiment where an irreversible reduction peak is observed during the cathodic scan around  $-0.70 \text{ V}$ . The corresponding spectral changes are summarized in the 3D plot (Figure 4.12.b). A band centered at  $410 \text{ nm}$  evolves during the forward scan that decreases during the backward scan. This band has to be related to reduction products of *o*-Va. The corresponding voltabsorptogram at  $410 \text{ nm}$  (Figure 4.12.c) provides much more information about the evolution of the absorbance during the potential scan. As can be observed in Figure 4.12.c, absorbance at  $410 \text{ nm}$  increases progressively while the potential applied is lower than  $-0.65 \text{ V}$  yielding a product that is not readily oxidized in the backward scan. During the backward scan, absorbance at  $410 \text{ nm}$  decreases when the potential applied is higher than  $-0.65 \text{ V}$ . In this case, absorbance decreases because of the diffusion of the product of the reduction reaction to the bulk solution but not because an electrochemical

oxidation is occurring. Derivative voltabsorptogram at 410 nm, Figure 4.12.d, is very similar to the cyclic voltammogram (Figure 4.12.a) supporting the conclusion extracted from the electrical signal. Thus, there is no oxidation during the backward scan and the electrochemical reaction can be considered as irreversible.

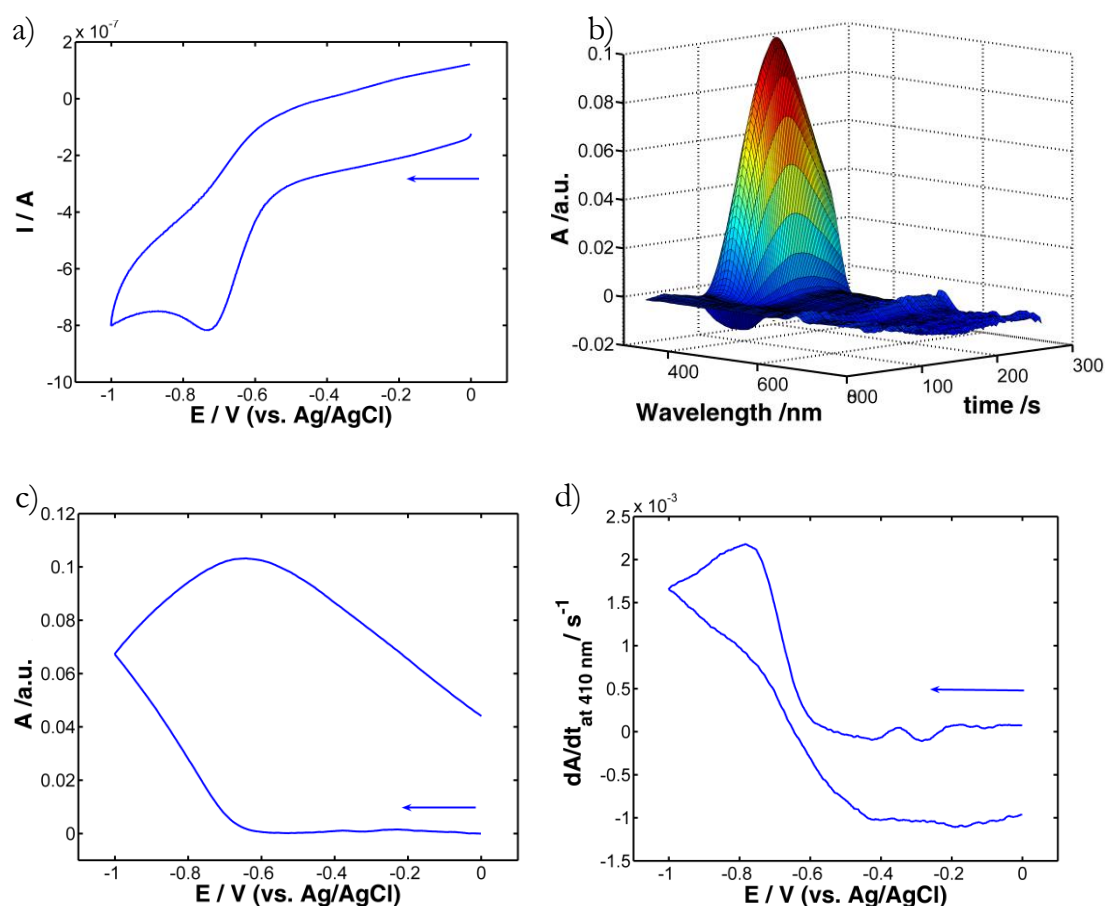


Figure 4.12 Spectroelectrochemistry signals obtained in a  $10^{-4}$  M *o*-Va solution with 0.1 M TBAPF<sub>6</sub> in DMSO during a cyclic voltammetric experiment. The potential was scanned at 0.01 V·s<sup>-1</sup> from +0.00 V to -0.90 V (a) Cyclic voltammogram, (b) 3D plot absorbance/potential (time)/wavelength, and (c) voltabsorptogram at 410 nm.

In order to obtain spatial information about the products generated during the *o*-Va reduction, chronoamperometric experiments at -0.90 V were performed sampling the solution close to the electrode at different distances from the electrode surface. In this case, the collimated light beam is moved from a position 1500  $\mu\text{m}$  far away from the electrode toward the electrode surface at a

rate of  $10 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ . Figure 4.13 shows the spectra automatically recorded at different distances during the reduction process. As it is expected from the previous experiment (Figure 4.12), a band around 410 nm is observed during the experiment when the light beam is approaching to the electrode, confirming the generation of the same compound observed in the voltammetric experiment. The shape of the absorbance band does not change at different distances from the electrode, while the light beam is sampling solution inside the diffusion layer, and therefore the product of the reaction ( $o\text{-Va}^-$ ) does not suffer any chemical reaction.

A better understanding of the experimental signals obtained during reduction of  $o\text{-Va}$  required the use of TDDFT calculations. In this way we have calculated the theoretical spectra of the suggested products of the electrochemical reactions. Comparison of TDDFT-theoretical results with spectroelectrochemistry experimental data provides valuable information that helps us to assign the band that evolves in the UV-Vis spectra, and to shed more light on this reaction mechanism.

The calculated and experimental electronic spectra of  $o\text{-Va}$  in DMSO have been previously compared<sup>93</sup>. Thus,  $o\text{-Va}$  exhibits two absorption bands. The first one, centered at 340 nm, is assigned to a transition from the highest occupied molecular orbital (HOMO) to the lowest unoccupied molecular orbital (LUMO), whereas the band centered at 270 nm is assigned to a transition from the HOMO  $-1$  to the LUMO. Both, the HOMO  $-1$  and the HOMO, present a bonding character between groups of carbon atoms in the ring and a non-bonding character in the oxygen atoms. On the other hand, the LUMO is mainly non-bonding both in the carbon atoms in the ring and in the oxygen atoms. Regarding the reduction products of  $o\text{-Va}$ , the spectrum plotted in the absorbance-wavelength plane in the 3D plot of Figure 4.13 shows the simulated spectra of reduced anion  $o\text{-Va}^-$ . This calculated spectrum shows a strong absorption band at 421 nm identical to that observed experimentally at 410 nm. This band can be attributed to the electronic transition from the HOMO to the

LUMO + 3 in the alpha orbital space. From these results can be affirmed that only  $o\text{-Va}^-$  is generated during the electrochemical reduction of  $o\text{-Va}$ , and experimentally, the irreversible reduction of  $o\text{-Va}$  is observed. Therefore, the irreversibility of this process should be ascribed to a low electron transfer rate constant. To verify this hypothesis, we have performed experiments in a wider potential window.

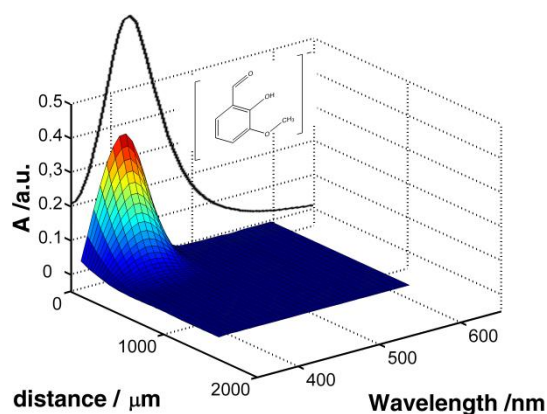


Figure 4.13. 3D plot absorbance/distance from the electrode surface/wavelength obtained during chronoamperometric experiment at  $-0.90$  V during  $150$  s in  $10^{-3}$  M  $o\text{-Va}$  solution with  $0.1$  M TBAPF<sub>6</sub> in DMSO. Slit scan rate of  $10 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ . Inset in absorbance-wavelength plane show the simulated spectra of the reduced form of  $o\text{-Va}$  ( $o\text{-Va}^-$ ).

Figure 4.14 shows the spectroelectrochemistry responses corresponding to a set of cyclic voltammetry experiments performed at different scan rates. In all cases, the initial potential was  $0.00$  V, that was scanned to  $-1.00$  V during the reduction scan; in the backward sweep, the potential was scanned to  $+0.60$  V, finishing the experiment at  $0.00$  V. All the experiments were performed in a  $10^{-3}$  M  $o\text{-Va}$  solution with  $0.1$  M TBAPF<sub>6</sub> as supporting electrolyte in deoxygenated DMSO. Figure 4.14.a shows the corresponding voltammograms obtained at  $0.005 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$ ,  $0.01 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$ ,  $0.02 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$ ,  $0.05 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$  and  $0.10 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$ . Two peaks, one in the cathodic scan around  $-0.70$  V, and other in the anodic scan around  $+0.40$  V, are observed at the six scan rates. The intensity of the two peaks increases with the square root of the scan rate. Figure 4.14 b shows the evolution of the spectra at  $0.005 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$  during the reduction process from  $-0.75$  V to  $-1.00$  V (blue thick

lines) and during the corresponding oxidation process from -0.20 V to +0.25 V through the anodic vertex (red thin lines). As can be observed in this figure, the wave shape of the absorption band and the evolution of the spectra are very similar, indicating an interconversion between the same compounds ( $o\text{-Va}^-/o\text{-Va}$ ). During the cathodic scan, a band centered at 325 nm related to  $o\text{-Va}$  (transition from HOMO to LUMO) decreases concomitantly with the increase of another band centered at 410 nm assigned to the reduced product,  $o\text{-Va}^-$  (transition from the HOMO to the LUMO +3). During the anodic scan, the opposite behavior is observed, indicating the transformation of  $o\text{-Va}^-$  into  $o\text{-Va}$ . Moreover, the isosbestic point at 360 nm is observed in both the reduction and oxidation processes (inset Figure 4.14.b).

Figure 4.14.c shows the voltabsorptograms at the maximum of absorption, 410 nm, obtained at the different scan rates. As can be expected, and in agreement with the cyclic voltammograms, the extent of  $o\text{-Va}$  reduction strongly depends on the scan rate. The lower the scan rate is, the higher absorbance value is obtained because more  $o\text{-Va}$  is reduced. Absorbance values at 410 nm increase when the potential applied is lower than -0.65 V, that is, when a high enough reduction overpotential is achieved. Next, in the backward scan, from -0.60 V to +0.30 V absorbance at 410 nm decreases because of the diffusion of the reduction product to the bulk solution. From +0.30 V onward the oxidation of  $o\text{-Va}^-$  takes place as was evidenced by the electrical signals, yielding a deep change in the slope of the absorbance when it is decreasing. Finally, a constant value of absorbance is recovered at the end of all the experiments. This constant value is almost the initial zero value of absorbance at slower scan rates, 0.005 and 0.01  $\text{V}\cdot\text{s}^{-1}$ . However, at higher scan rates, the final value of absorbance is clearly different from zero because the reduced form of  $o\text{-Va}$  that has diffused away from the diffusion layer cannot return entirely to be reoxidized. Therefore, taking into account the backward scan, we can observe that the faster the scan rate, the smaller the change in absorbance due to the diffusion is. Moreover, this behavior is typical of an electrochemically irreversible process.

Actually, derivative voltabsorptograms at 410 nm (Figure 4.14.d) and cyclic voltammograms behaviors (Figure 4.14.a) are very similar. Thus, the optical signal confirms the two redox processes observed in the electrical signal. However, whereas the electrical signal does not provide molecular information, the spectrum provides very suitable information about the electrochemical process, indicating in this case, that the oxidation process is completely correlated with the reduction one.

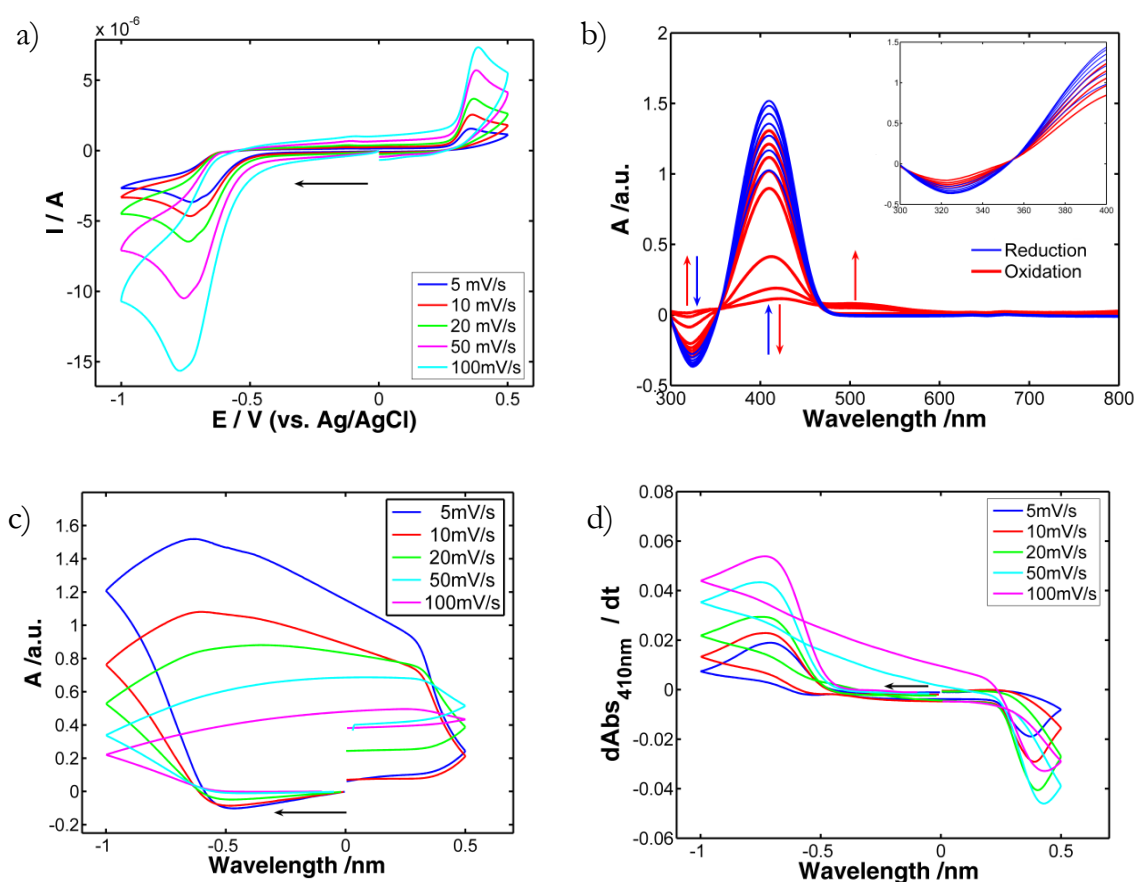


Figure 4.14 Spectroelectrochemistry signals obtained during cyclic voltammetry experiments at different scan rates in a  $10^{-3}$  M *o*-Va solution with 0.1 M TBAPF<sub>6</sub> in DMSO. The potential was scanned from +0.00 V to -1.00 V, returning to +0.60 V and finishing at the initial potential, 0.00 V. (a) Cyclic voltammograms, (b) spectra evolution during the experiment performed at  $0.005 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$ , (c) voltabsorptograms at 410 nm, and (d) derivative voltabsorptograms at 410 nm. Inset in (b) is a zoom of the spectra evolution between 300 and 400 nm.

To confirm that *o*-Va<sup>-</sup> is oxidized at +0.30 V, we compare two experiments in which the scans start in different direction. Figure 4.15 shows two



spectroelectrochemistry experiments obtained in a deoxygenated solution of  $10^{-3}$  M *o*-Va with 0.1 M TBAPF<sub>6</sub> as supporting electrolyte in DMSO. In both experiments, the scans start at 0.00 V and the potential window was set between -1.00 V and +0.60 V. The only difference between these two experiments is that in one of them the cycle starts in the anodic direction and in the other one starts in the cathodic direction. The two cyclic voltammograms (Figure 4.15.a) show the same shape, finding the main difference in the oxidation peak intensity, significantly higher when *o*-Va has been previously reduced.

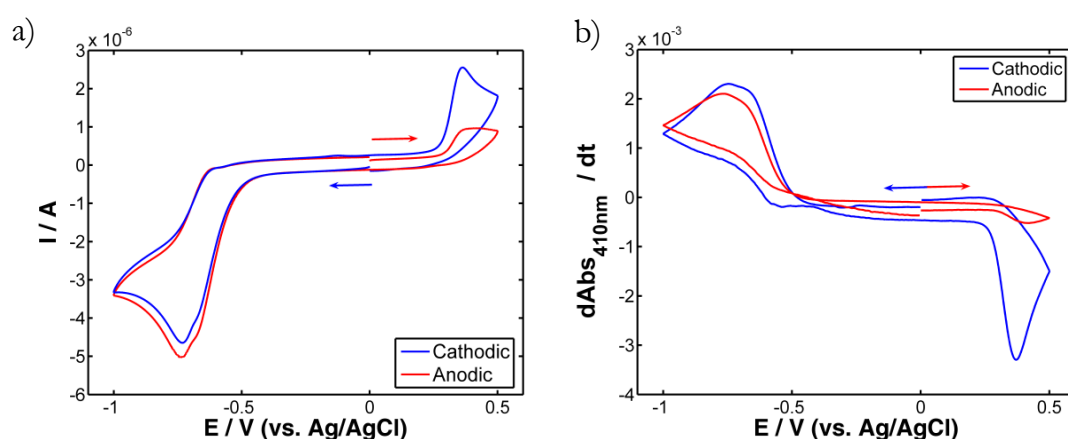


Figure 4.15 Spectroelectrochemistry signals obtained at  $0.01 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$  in a  $10^{-3}$  M *o*-Va solution with 0.1 M TBAPF<sub>6</sub> in DMSO, starting the experiment in the cathodic direction (blue line) and in the anodic direction (red line). The potential window was from -1.00 V to +0.60 V, starting and finishing both experiments at 0.00 V. (a) Cyclic voltammogram, and (b) derivative voltabsorptograms at 410 nm.

Thus, in the experiment starting in the cathodic direction (blue line in Figure 4.15.a) first, *o*-Va is reduced to generate *o*-Va<sup>-</sup>, which is subsequently oxidized in the backward scan at potentials higher than +0.30 V. When the experiment starts through the cathodic direction, the derivative voltabsorptogram at 410 nm (blue line in Figure 4.15.b) shows the same behavior that the voltammogram, with an intense oxidation peak around +0.36 V. In the experiment starting in the anodic direction (red line in Figure 4.15) the general behavior is very similar to the previous one, with a cathodic peak around at -0.73 V and an anodic peak around +0.36 V. The main differences are detected in the anodic scan because the anodic peak, in both the voltammogram and in the

derivative voltabsorptogram, is significantly lower in the experiment starting in the anodic direction than in the experiment starting in the cathodic one. This fact can be explained because  $o\text{-Va}^-$  has not been previously generated and it cannot be reoxidized in the anodic scan. In this case this anodic peak should be only related to  $o\text{-Va}$  oxidation. Oxidation of vanillin derivatives has been previously studied by Compton and co-workers<sup>383</sup>.

It is well known that the superoxide emerges in DMSO solutions when the media is not deoxygenated because oxygen is reduced in these solvent in a one-electron process<sup>394,395</sup>. Here we present the study of the reduction of  $o\text{-Va}$  in presence of oxygen evidencing the power of spectroelectrochemistry to analyze electrochemical processes. Figure 4.16, shows the comparison between the spectroelectrochemical responses obtained in two different experiments, one carried out in a non-deoxygenated solution and the other performed in a solution deoxygenated by a nitrogen flux during 15 minutes. The other experimental conditions are equal for the two experiments. A cyclic voltammetry is performed at  $0.010 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$  starting at 0.00 V in the cathodic direction in a potential window between -1.00V and +0.60 V in a  $2\cdot 10^{-4} \text{ M } o\text{-Va}$  solution with 0.1 M  $\text{TBAPF}_6$  as support electrolyte in DMSO. Simultaneously, the absorption spectra evolution is registered. Figure 4.16.a shows the comparison between the cyclic voltammograms in presence (blue line) and in absence (red line) of oxygen. As can be seen, a new reversible redox couple is observed at -0.77 V in the experiment in presence of oxygen, that is related to the reduction of oxygen in DMSO to generate superoxide indicating that the mechanism of reaction is clearly different.

The presence of oxygen also provokes that the absorbance at 410 nm, related to  $o\text{-Va}$ , achieves higher values than in deoxygenated solutions (Figure 4.16.b). Therefore, we can deduce that the well-known property of  $o\text{-Va}$  as scavenger of free radicals plays an important role in the process<sup>100,396</sup>. In the reduction scan, the dissolved oxygen in the solution is electrochemically reduced to superoxide,  $\text{O}_2^-$ . Then,  $o\text{-Va}$  molecules are chemically reduced neutralizing the

superoxide generation. For this reason, a higher amount of *o*-Va is reduced to *o*-Va<sup>-</sup>, as can be seen in Figure 4.16.b. Therefore, *o*-Va<sup>-</sup> is formed electrochemically in the deoxygenated solution (red lines, Figure 4.16) and chemically in the oxygenated media (blue lines, Figure 4.16), that leads to a smaller oxidation peak around +0.40 V in the deoxygenated than in the oxygenated experiment, because less amount of *o*-Va is reduced due to the absence of superoxide.

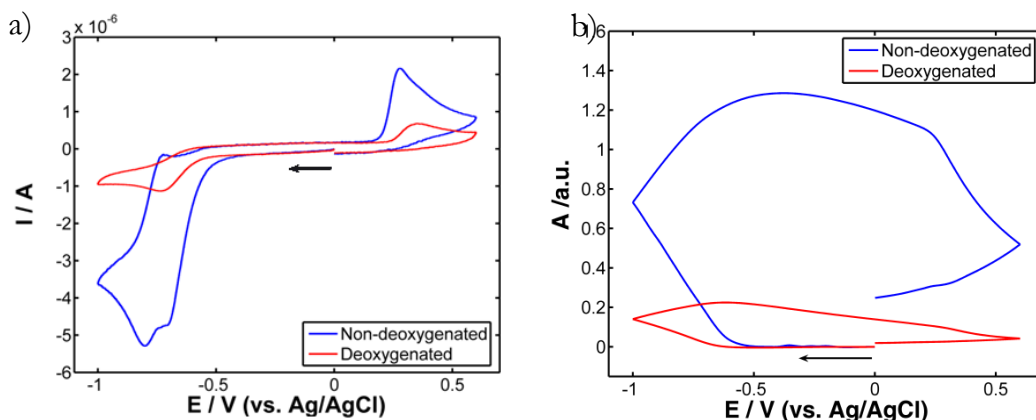


Figure 4.16 Spectroelectrochemistry signals obtained in a  $10^{-3}$  M *o*-Va solution with 0.1 M TBAPF<sub>6</sub> in DMSO during a cyclic voltammetry experiment. The solution was non-deoxygenated (blue line) and deoxygenated (red line). The potential was scanned at  $0.01 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$  from +0.00 V to -1.00 V, returning to +0.60 V and finishing at the initial potential, 0.00 V. (a) Cyclic voltammograms, and (b) voltabsorptograms at 410 nm.

#### 4.2.5 Conclusions

A new long optical path-length cell for UV-Vis spectroelectrochemistry has been developed. This cell has demonstrated to be very useful in the study of electrochemical processes, allowing us to obtain not only time-resolved spectra in a fixed position close to the electrode but also information about the distribution of the reaction products at different distances from the electrode surface. First, the cell has been validated using a simple electrochemical couple such as *o*-tolidine/*o*-tolidinium cation. Next, the study of the electrochemical processes occurred during oxidation and reduction of *o*-Va was accomplished. Comparison between experimental and theoretical results indicates that the reduction of *o*-Va

proceeds through the production of the carbanion in an irreversible electrochemical reaction. The presence of oxygen in the reaction media changes substantially the reduction process of *o*-Va being linked to a chemical reaction with the electrogenerated superoxide. Therefore, spectroelectrochemistry has been proven to be also very useful to elucidate the mechanism of reaction of *o*-Va when it acts as antioxidant.

### 4.3 Bidimensional Spatial Scanning Spectroelectrochemistry at solid/liquid interfaces.

#### 4.3.1 Introduction

Spectroelectrochemistry (SEC) is a powerful instrumental technique that combines two classical analytical techniques, such as electrochemistry and spectroscopy, to obtain *in situ* chemical information<sup>153,397–401</sup> about the reactions taking place during an electrochemical experiment. Usually, the electrochemistry technique controls the chemical process, while the spectroscopy one provides molecular information about chemical compounds involved in the process being complementary to the electrochemical information achieved from the electrical response. Since 1964, when Kuwana proposed this technique<sup>142</sup>, many approaches using different experimental setups<sup>164,265,287,288,298,402,403</sup> have been proposed to improve the quality and significance of the spectroelectrochemical experiments, trying to shed more light on the processes involved in the electrochemical reactions.

UV-Vis absorption spectroelectrochemistry can be performed in two different optical configurations taking into account the position of the light beam with respect to the working electrode: normal<sup>305,311</sup> and parallel<sup>326,328,393</sup> arrangement. On the one hand, in normal configuration the light beam goes through the diffusion layer perpendicularly to the working electrode surface. In this case, a transmission<sup>314,332</sup> or a reflectance<sup>303,313</sup> experimental set-up can be used. On the other hand, in parallel configuration, also known as long-optical-pathway configuration, the light beam passes parallel to the electrode surface, with the light beam sampling the adjacent solution to the electrode surface<sup>328,333,404</sup>. Each configuration provides different type of information about the processes occurring at the electrode surface. Normal configuration mainly supplies information about the whole diffusion layer, including the compounds adsorbed or crystallized on the electrode surface, but also a small contribution of species in the solution near the electrode can be detected. However, parallel

configuration only provides information about the processes occurring in the solution close to the electrode. Besides, this second arrangement guarantees a longer optical pathway than in normal configuration. The main drawback of parallel configuration is that it is insensitive to adsorption/crystallization phenomena taking place on the electrode surface.

Usually, only one of these configurations is chosen depending on the chemical problem, but in many cases both kinds of information are necessary to fully understand the chemical system studied. In this respect, bidimensional spectroelectrochemistry<sup>200</sup> (BSEC) allows us to perform simultaneously measurements in the two configurations, obtaining in only one experiment a more complete picture on the electrode processes. The main disadvantage of BSEC is the complexity of the spectroelectrochemical cells to get reproducible and good enough experimental results. In this work, on one side we use a simple three electrode system placed in a spectrophotometric cuvette together with a reflection probe for normal configuration measurements. On the other side we use piezoelectric positioners to control the position of a slit that allows us to place the light beam adjacent to the electrode at controlled distances. Thus, although parallel beam alignment is usually very complex and troublesome, by using this new approach, previously tested with liquid/liquid interfaces and with the study of the electrochemical reduction of *o*-Va, the experiments can be performed in a very simple and easy way.

In a first step, *o*-tolidine has been selected as reference system to prove the good performance of this new spectroelectrochemical set-up<sup>200,338,405</sup>. Finally, BSEC has been used to study the electrochemical mechanism of reaction of Cu-*o*-Va complex,  $[\text{Cu}(\text{o-Va})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$  (*o*-Va = *o*-Vanillin, 2-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde). This complex is an antimutagenic, anticarcinogenic agent and exhibits superoxide dismutase (SOD) mimic properties. These well-known properties are typical of several complexes with copper as metal center<sup>90-92,406-412</sup>. Copper is attached with antitumoral compounds, as Schiff bases used as ligands, many of them derived of *o*-vanillin. This ligand has demonstrated to have

antimutagenic and carcinogenesis inhibitory activities<sup>86–89,101</sup>. Moreover, it is an antioxidant agent and scavenger of free radicals<sup>396,413</sup>.

In this work we report the usefulness of the new BSEC spectroelectrochemical setup (Figura 3.47) proposed to understand the electrochemistry of  $[\text{Cu}(o\text{-Va})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$  in dimethylsulfoxide solution.

### 4.3.2 *Experimental section*

#### 4.3.2.1 Chemicals and Materials

*o*-Tolidine (Sigma-Aldrich), *o*-vanillin (*o*-Va, Sigma-Aldrich), tetrabutylammonium hexafluorophosphate (TBAPF<sub>6</sub>, Merck), dimethylsulfoxide (Sigma-Aldrich), acetic acid (Acros Organics) and perchloric acid (Acros Organics) are analytical grade and used as received without further purification.  $[\text{Cu}(o\text{-Va})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$  was prepared according to a reported synthesis procedure<sup>382,414</sup> from equimolar amounts of *o*-Va and  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ . *o*-Va was dissolved in methanol and drop wise added, under continuous stirring to a 2:1 methanol:water solution of  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ . The mixture was stirred for 30 min, and it left to stand at room temperature until bright yellowish green monocrystals were obtained. Deionized water with a resistivity of 18MΩ cm (Milli-Q purification system, Millipore, UK), is used to prepare aqueous solutions. Analytical grade DMSO (Fisher Chemical) was used for prepared nonaqueous solutions. For safety considerations, all handling and processing were performed carefully particularly when *o*-tolidine and DMSO was used.

#### 4.3.2.2 Instrumentation

Spectroelectrochemical experiments were carried out using a PGSTAT 302N potentiostat mentioned in section 3.3.1.5 coupled to two QE65000 Spectrometers (section 3.3.1.3) one for each configuration. A DH-2000 Deuterium-halogen light source, (section 3.3.1.1) was connected to a bifurcated fiber that is connected to a 450-μm diameter optical fiber for the parallel

configuration and a reflection probe, to obtain measurements in normal configuration, the optical fibers and the reflection probe were described above in section 3.3.1.2. The light beam is conducted by an optical fiber to a collimating lens that is fixed to the slit holder. The light beam that samples the solution in parallel configuration is collected by a collimating lens and it is conducted to the spectrometer using a 450- $\mu\text{m}$  diameter optical fiber. Mass spectrometry experiments were carried out using a Micromass AutoSpec described in section 3.3.1.6.

### 4.3.3 Results and discussion

#### 4.3.3.1 Validation

The experimental set-up for BSEC measurements was validated using *o*-tolidine. This well-known reference system for spectroelectrochemistry was chosen because it exhibits a fast two electron transfer and a large molar absorption coefficient in water,  $\epsilon = 60670 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  at 438 nm<sup>327</sup>. Figure 4.17 shows a validation experiment carried out by cyclic voltammetry, scanning the potential between +0.45 V and +0.80 V at  $0.005 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$  in a  $10^{-4} \text{ M}$  *o*-tolidine, 0.5 M acetic acid and 1 M perchloric acid solution.

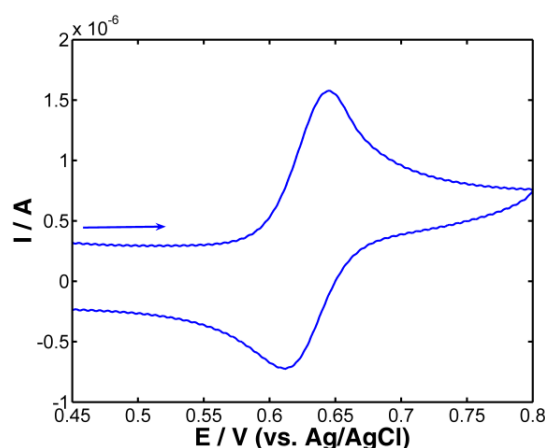


Figure 4.17 Cyclic voltammogram from +0.45 V to +0.80 V at  $0.005 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$  in a  $10^{-4} \text{ M}$  *o*-tolidine, 0.5 M acetic acid and 1 M perchloric acid solution



The corresponding cyclic voltammogram (CV) obtained during electrooxidation of *o*-tolidine, with an anodic peak emerging at +0.65 V that is related to the electrogeneration of *o*-tolidinium cation, and a reversible cathodic peak at +0.61 V that is related to the reduction of this cation to *o*-tolidine.

The evolution of the spectra with time (potential) in normal and parallel configuration, obtained during the electrochemical reaction, is shown in Figure 4.18.a, and Figure 4.18.b. In both figures the corresponding contour plots of these 3D images are overlapped to a better understanding of absorbance changes. In the two configurations, a characteristic maximum of absorbance at 438 nm due to the generation of *o*-tolidinium cation can be observed. In the backward scan, the absorbance values of this band decreases due to the regeneration of *o*-tolidine. The main differences between the spectra in the two spectrophotometric arrangements is the absorbance value, higher in parallel configuration due to the longer optical path-way compared with that in normal configuration. This fact makes more sensitive the parallel arrangement for studying electrochemical processes in which only soluble compounds are involved.

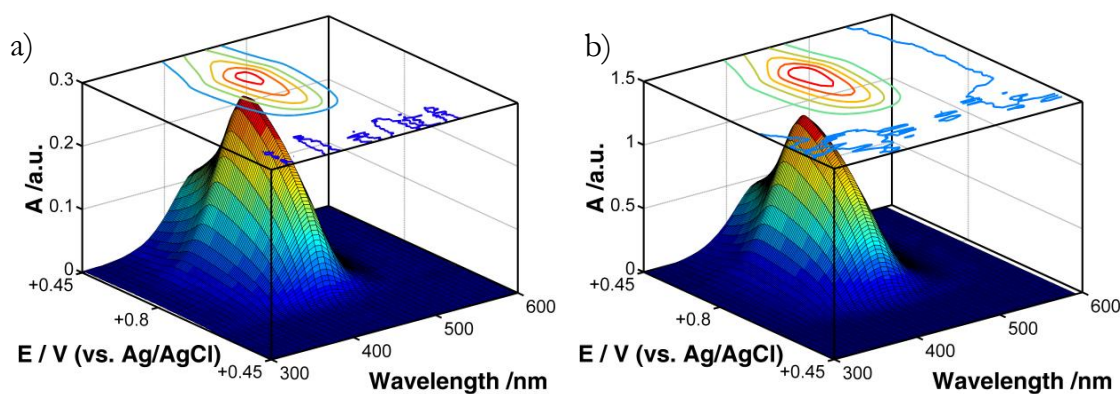


Figure 4.18 3D and contour plots of spectra evolution during a cyclic voltammetry experiment. a) in normal configuration b) parallel configuration. Potential was scanned from +0.45 V to +0.80 V at  $0.005 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$  in a  $10^{-4} \text{ M}$  *o*-tolidine, 0.5 M acetic acid and 1 M perchloric acid solution.

Figure 4.19.a and Figure 4.19.b shows the derivative voltabsorptograms (DCVA) at 438 nm obtained in normal and parallel configuration, respectively. DCVA in normal configuration at the maximum of absorption is proportional to

the current intensity<sup>200</sup>, thus, as it is expected, CV and DCVA in normal configuration (Figure 4.17 and Figure 4.19.a) show the same shape. The good agreement between these two signals indicates the good performance of the spectroelectrochemical cell in normal configuration.

On the other hand, DCVA at 438 nm in parallel configuration and CV (Figure 4.17 and Figure 4.19.b) show a different behavior because the optical response in this arrangement is not only related to the amount of *o*-toluidine that has been oxidized but also to the heterogeneous distribution of the *o*-tolidinium cation in the solution that is sampled by the light beam<sup>200</sup>. This is the main reason that explains the different peak intensity of DCVA at 438 nm in parallel configuration in the forward and backward scan. These results indicate the suitable implementation of parallel configuration in the spectroelectrochemical set-up proposed.

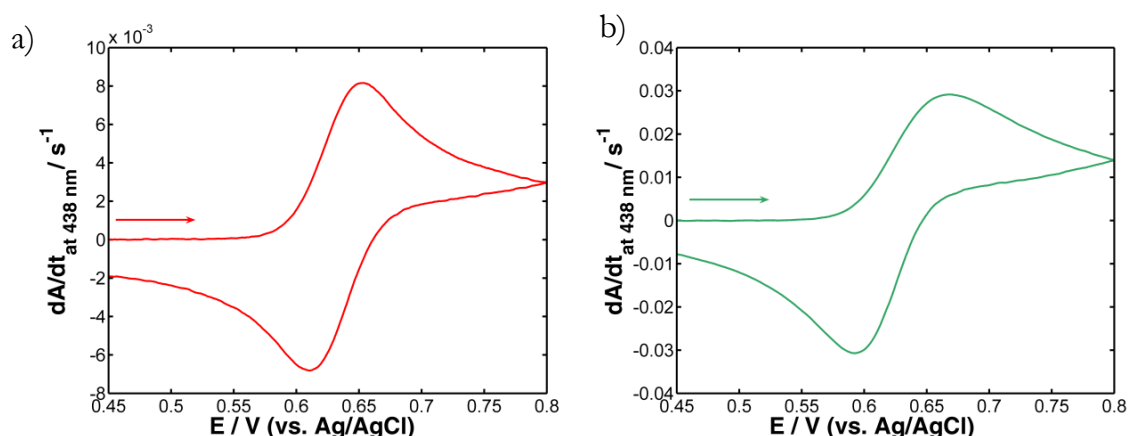


Figure 4.19 Derivative voltabsorptogram a) in normal configuration, b) in parallel configuration. Potential was scanned from +0.45 V to +0.80 V at  $0.005 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$  in a  $10^{-4} \text{ M}$  *o*-toluidine, 0.5 M acetic acid and 1 M perchloric acid solution.

Furthermore, three chronoamperometry experiments were performed using the spatial scanning approach in combination with bidimensional spectroelectrochemistry to observe the distribution of the *o*-tolidinium cation along the solution near to the electrode at different times, Figure 4.20. The first experiment was a chronoamperometry at +0.80 V for 70 s. In this experiment the parallel light beam is placed in a fix position close to the electrode surface. Figure

4.20.a and Figure 4.20.b show the spectra evolution with time in the two optical configurations, normal and parallel, respectively. In this case, the slit is not moved along time and, therefore, the spectra in both arrangements exhibit the same behavior, the only difference is the values of the absorbance, higher in the parallel arrangement due to the longer optical pathway.

Figure 4.20.c and Figure 4.20.d show the spectra evolution in normal and parallel configurations for the same chronoamperometry at +0.80V for 70 s. Now, the slit is moved at  $15 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$  during the experiment from a position 1.05 mm away from the working electrode surface to it. As can be observed, the 3D surface related to the normal configuration (Figure 4.20.c) shows the same behavior that the spectra of the motionless experiment (Figure 4.20.a). However, spectra in parallel arrangement (Figure 4.20.d) shows a completely different waveform, because the solution is sampled at different distances from the electrode surface.

Finally, a third experiment was performed starting to move the slit from the bulk solution to the electrode surface after applying the potential to the system. Figure 4.20.e and Figure 4.20.f show the response obtained for the two optical arrangements. In this case, +0.80 V were applied for 50 s and then the slit start to move at  $15 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$  towards the electrode surface during another 70 s. In this way, in normal arrangement (Figure 4.20.e) the generation of *o*-tolidinium cation can be detected when the potential is applied and when the potential is no longer applied. As can be seen when no potential is applied, from 50 s onwards, a decrease of absorbance is observed. On the other hand, in the parallel arrangement we can observe how *o*-tolidinium cation distributed, showing a maximum concentration far away from the electrode surface (Figure 4.20.f) due to the diffusion of generated products to the bulk solution and because the change of the potential of the electrodes surface when it is leaved as an open circuit.

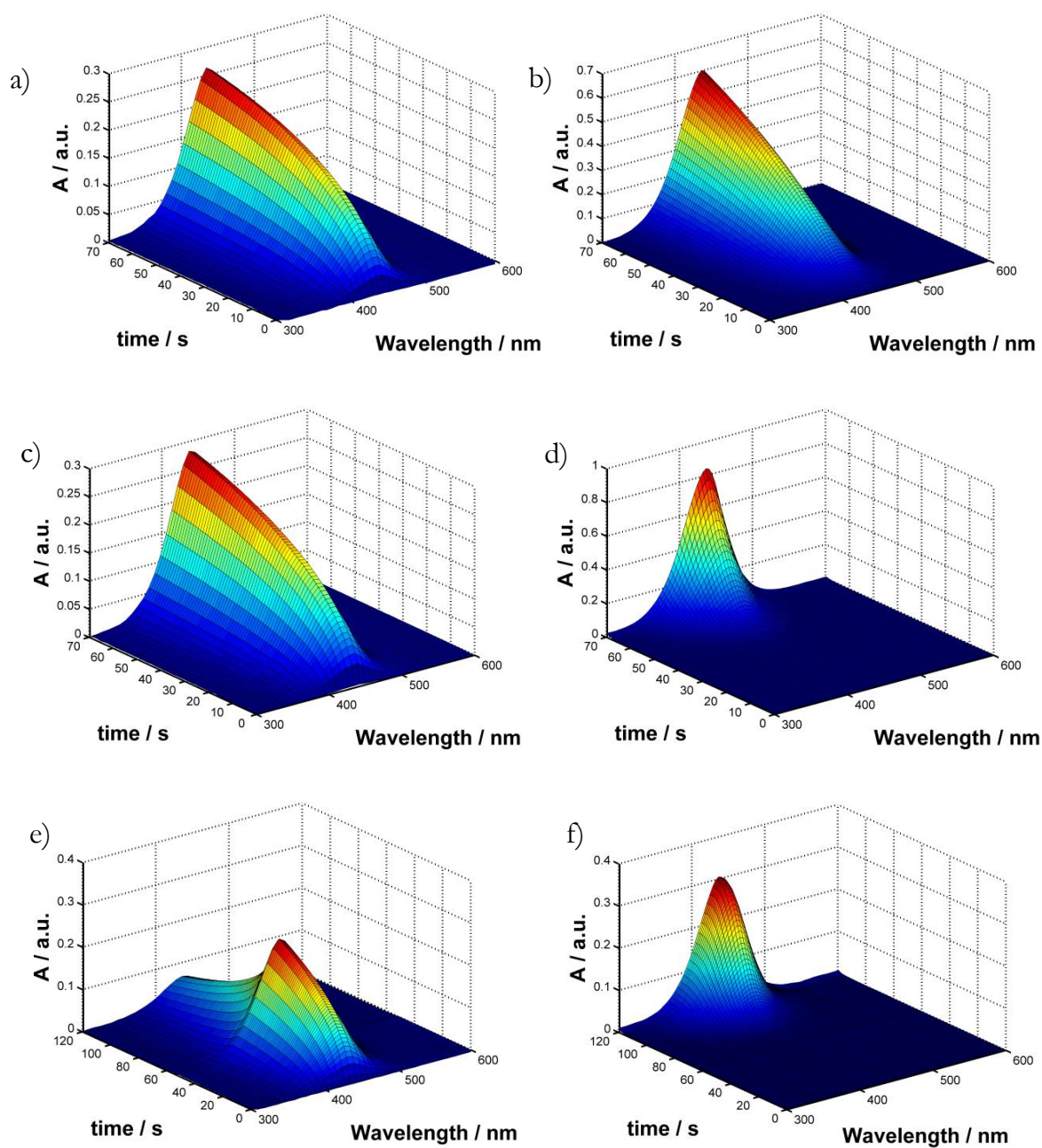


Figure 4.20 a) Normal arrangement and b) parallel arrangement in a chronoamperometry at +0.80 V during 70 s without moving the slit. c) Normal arrangement and d) parallel arrangement in a chronoamperometry at +0.70 V during 70 s moving the slit at  $10 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$  during the experiment e) normal arrangement and f) parallel arrangement in a chronoamperometry at +0.80 V (during 50 s and after applied potential the slit is moved during 70 s at  $15 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ ).

#### 4.3.3.2 Study of Cu-*o*-Va

The behavior of the optical and electrical responses indicates that high quality spectroelectrochemical measurements are obtained using the new BSEC set-up. Therefore, it is possible to use it to study a much more complex chemical system, as for example the electrochemical reaction mechanism of the Cu-*o*-Va. For this purpose, cyclic voltammetry experiments were performed using a wide potential window in order to obtain a whole picture of the redox processes in which Cu-*o*-Va is involved. Solutions were thoroughly purged by passing dry N<sub>2</sub> for 300 s before each experiment. Based on previous experiments, a potential window from -0.70 to +1.30 V was selected, fixing the starting and ending potential at 0.00 V where different electrochemical process took place. Using this potential window, two voltammetric cycles at 0.01 V·s<sup>-1</sup> were performed in a 10<sup>-3</sup> M Cu-*o*-Va and 0.1 M TBAPF<sub>6</sub> DMSO solution. The spectroelectrochemistry responses are summarized in Figure 4.21.

The CV of the first potential cycle (Figure 4.21.a, blue line) exhibits an ill-defined reduction process around -0.50 V and a clear irreversible oxidation peak at +1.18 V. Spectroscopic results provide complementary and very suitable information about the processes taking place during this reaction. Comparison of full spectra, shown as contour plots in normal and parallel configuration, Figure 4.21.b and Figure 4.21.c respectively, indicates a different behavior in the two configurations. A representation of the current respect to time/potential has been added at the left of the contour plot for an easier understanding of the absorption bands. In the first cycle, the spectra in normal configuration (Figure 4.21.b, blue line in E-I plot) show two main absorption bands. The first one band is observed at 475 nm, around -0.70 V, and the second one emerges at 510 nm, around +1.10 V. Analyzing the spectra in parallel configuration obtained during the first potential cycle (Figure 4.21.c, blue line in E-I plot), it is possible to observe that only the absorption band at 510 nm is observed. Figure 4.21.d shows the VA at 510 nm obtained during the first cycle for both configurations. As can be observed, during the reduction process, the absorbance in normal

configuration ( $A_N$ ) at 510 nm is higher than the absorbance in parallel configuration ( $A_P$ ) at the same wavelength, indicating that an electrodeposition process is taking place on the electrode surface. Therefore, we can conclude that during the cathodic scan, the reduction from Cu(II) to Cu(0) is taking place, while the reduction to Cu(I) is not observed because no absorption bands are observed in parallel configuration related to these processes. If the reduction reaction took place only in solution,  $A_P$  should be higher than  $A_N$  because of the difference of the optical pathways.

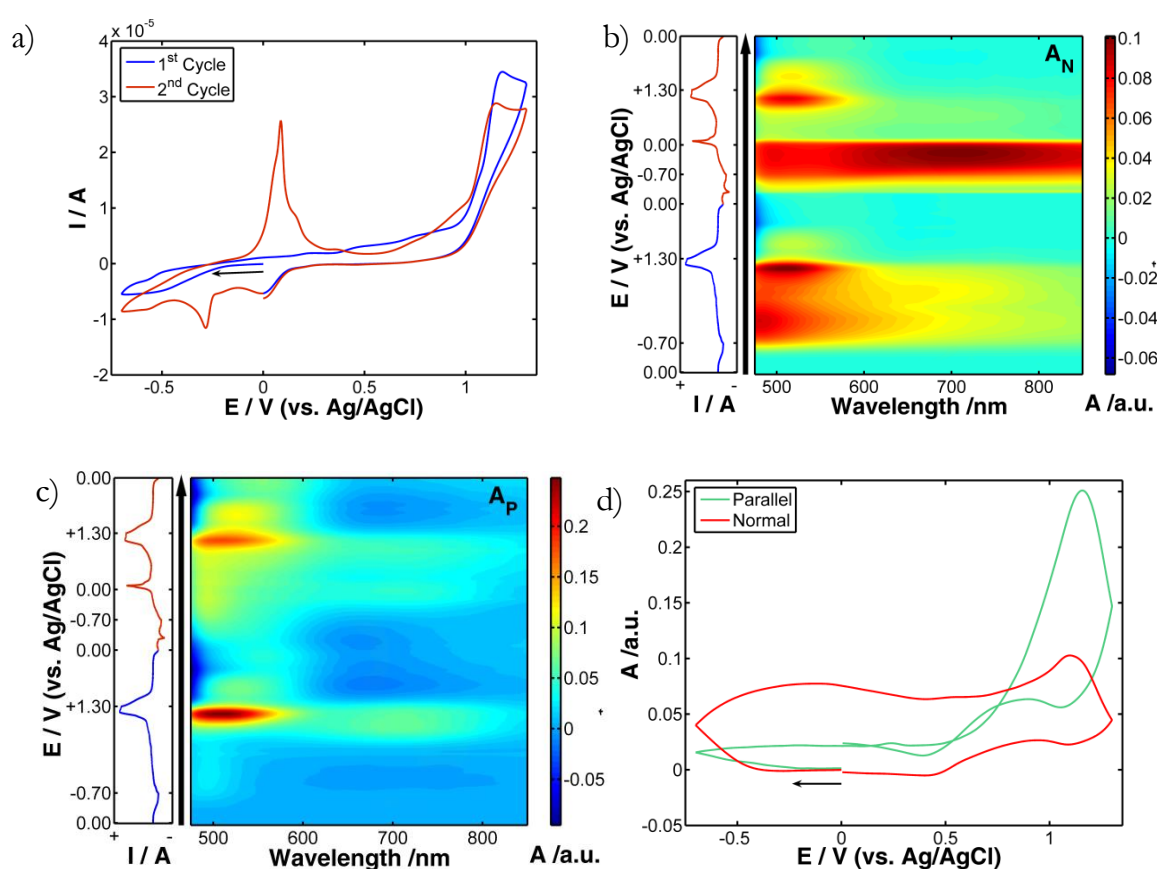


Figure 4.21 a) Cyclic voltammogram and contour plots of absorbance evolution with time (potential) in (b) normal and (c) parallel configuration during two potential cycles. d) Voltabsorptograms at 510 nm in normal and parallel configuration during the first potential cycle. Two potential cycles from 0.00 V to -0.70 V and back to +1.30 V, ending the experiment at 0.00 V, sweeping the potential at  $0.01 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$ . Experiment performed in  $10^{-3} \text{ M Cu-}o\text{-Va}$  and  $0.1 \text{ M TBAPF}_6$  DMSO solution.

During the anodic scan, the CV (Figure 4.21.a, blue line) does not show any defined oxidation peak due to the oxidation of Cu(0), but  $A_N$  around 475 nm in the contour plot (Figure 4.21.b, blue line) shows a very small decrease of  $A_N$  at 0.00 V that could be related to a very small oxidation of Cu(0). At more positive potentials, +1.10 V, an irreversible peak is observed both in the CV and the VA at 510 nm (blue line in Figure 4.21.a and Figure 4.21.d due to the oxidation of the Cu-*o*-Va. In this case,  $A_P$  at 510 nm is higher than  $A_N$  (Figure 4.21.d) indicating that this process is taking place only in solution. A similar behavior is observed in a pure *o*-Va solution, ascribing this oxidation peak to the oxidation of the *o*-Va ligand, as has been reported in previous works<sup>383</sup>. Finally, it should be mentioned that at the end of the first potential scan, a reduction peak is observed around 0.00 V in the voltammogram, but any change in the spectral signals is observed.

Inspecting the spectroelectrochemical responses during the second potential cycle a more complete map of the electrochemical reaction can be obtained. Two additional reduction peaks are observed during the second scan in the CV (Figure 4.21.a, red line). The first one at +0.06 V and the second one at -0.30 V, together with the ill-defined peak around -0.50 V, previously observed in the first cycle. During this second cycle, the reoxidation of Cu(0) at +0.05 V is clearly detected together with a post-peak shoulder that could be related to the reduction peak appearing at +0.06 V. Also, the oxidation peak of the *o*-Va ligand of the copper complex is observed in the two cycles. Moreover, contour plots of spectral responses in the second cycle (Figure 4.21.b and Figure 4.21.c) show some relevant changes compared with the first cycle. The more significant change is observed in the spectra evolution in normal configuration (Figure 4.21.b) where a very broad band around 720 nm is observed at potentials lower than 0.00 V. This absorption band disappears at potentials higher than 0.00 V. However, this absorption band at 720 nm is not observed in the spectra registered in parallel configuration. Therefore, this broad band peaking at 720 nm has to be ascribed to the generation of Cu(0) on the electrode, with the metal

being subsequently redissolved, as can be deduced from the sharp peak in the voltammogram at +0.05 V.

Consequently, from the spectra in normal configuration we can deduce that two different processes occur on the electrode surface. First, the deposition of nuclei of Cu(0) on the glassy carbon electrode during the first cycle (band at 475 nm, around -0.50 V), and next during the second cycle, the deposition of Cu(0) on Cu(0) nuclei yielding a Cu(0) film (broad band at 720 nm). On the other hand, in parallel configuration only the oxidation in solution of the ligand of the Cu-*o*-Va complex is observed (band at 510 nm, around +1.10 V). It is noteworthy that there is not any clear absorption band either in normal or parallel configuration related to the reduction peak appreciated around 0.00 V.

In the previous experiment the concentration of Cu-*o*-Va was too high to observe spectral changes below 475 nm, therefore we decide to decrease this value to  $5 \cdot 10^{-4}$  M. In addition, the preceding study was performed starting the experiment through the cathodic direction. To find out if this experimental condition determines the spectroelectrochemical behavior explained above, now we present a similar experiment but scanning the potential starting the experiment in the anodic direction. Thus, we carried out a cyclic voltammetry in a DMSO solution  $5 \cdot 10^{-4}$  M Cu-*o*-Va and 0.1 M TBAPF<sub>6</sub>, scanning the potential at  $0.010 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$  from +0.60 V to +1.20 V and back to -0.70 V, finishing at the starting potential, +0.60 V.

Figure 4.22 shows the three spectroelectrochemical responses obtained during this experiment. The CV (Figure 4.22.a) in this case only shows the irreversible oxidation peak at +1.10 V, the reduction peak at +0.06 V, another ill-defined around -0.50 V and the oxidation peak at +0.05 V. As in the former experiment, the sharp stripping oxidation peak at +0.05 V is overlapped with a less intense diffusive peak. The evolution of the spectra in normal configuration with the potential applied (Figure 4.22.b) confirms that the copper complex is oxidized at +1.10 V, as can be deduced from the band evolving at 510 nm. Additionally a narrow and well-defined absorption band emerges at 425 nm at



potentials where no electrochemical reaction is taking place. This experimental result must be explained as a chemical reaction of the oxidized Cu- $\theta$ -Va complex to form a new complex that is subsequently reduced at +0.06 V.

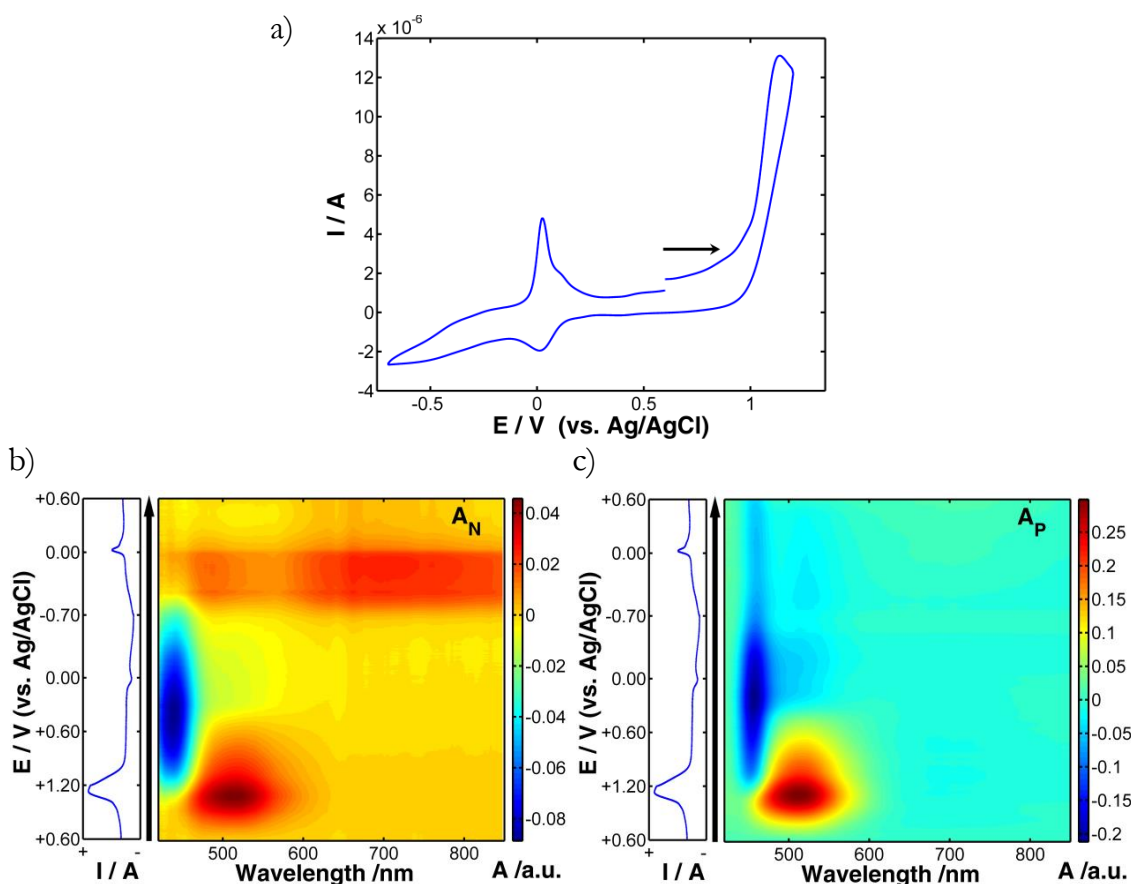


Figure 4.22 Spectroelectrochemistry responses obtained during the potential scan in a  $5 \cdot 10^{-4}$  M Cu- $\theta$ -Va and 0.1M TBAPF<sub>6</sub> solution in DSMO for a potential window from -0.7 V to 1.3 V. Scan rate:  $0.010 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$  (a) Cyclic voltammogram starting in anodic direction, starting potential 0.00 V, (b) contour plot in normal arrangement, (c) contour plot in parallel arrangement.

Contour plot of spectra in parallel configuration (Figure 4.22.c) confirms this hypothesis because both bands, 510 nm and 425 nm, are also observed indicating that both processes, oxidation of the complex and the next chemical reaction, take place in solution. The main difference appreciated between the two optical responses is observed in the cathodic region. As in the experiment shown in Figure 4.21, the electrodeposition of Cu(0) is only observed in normal arrangement (Figure 4.22.b), yielding a Cu(0) film on the electrode that is

redissolved around +0.05 V as is evidenced in the sharp peak observed in the backward scan of the CV (Figure 4.22.a).

The reduction peak at +0.06 V is attributed in the bibliography to a quasi-reversible electron transfer process<sup>382</sup> for the redox couple  $\text{Cu}^{\text{II}}/\text{Cu}^{\text{I}}$ . Joining this assignment to our results, we can suggest that the pristine Cu-*o*-Va complex can only be reduced directly to Cu(0) (first cycle in Figure 4.21) that implies the breakdown of the complex. However, when the Cu-*o*-Va complex is oxidized, the oxidation takes place over the phenolic oxygen of the ligand. The new complex right after, can be reduced from Cu(II) to Cu(I). The absence of the reduction peak at -0.30 V in this experiment, indicates that the presence of this peak in the second cycle of the CV in the previous experiment, Figure 4.21.a, should be related to the reduction of free Cu(II) generated during the reoxidation in this second scan of the Cu(0) nuclei, that were deposited in the first scan.

New cyclic voltammetric experiments with a more diluted solution were performed to demonstrate with certainty the reduction of the oxidized Cu(II)-complex to Cu(I)-complex. In this case, the experiments were done reaching a vertex potential in the cathodic direction where the generation of Cu(0) is avoided. Cyclic voltammetry experiments were carried out between -0.10V and +1.25 V, potential window wide enough to provoke the reduction from Cu(II) to Cu(I), but not to yield to Cu(0). For comparison with the results shown above in Figure 4.21 and Figure 4.22, two experiments were performed, both working with  $10^{-4}$  M Cu-*o*-Va and 0.1 M TBAPF<sub>6</sub> DMSO solutions, scanning the potential at  $0.005 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$ . The first experiment starts in the cathodic direction (Figure 4.23) while the second one is carried out through the anodic direction (Figure 4.24). In the first case (Figure 4.23), two cycles were performed from +0.50 V to -0.10 V and back to +1.20 V, ending the experiment at the starting potential, +0.50 V. The CVs registered (Figure 4.23) show that during the first cathodic scan the reduction of Cu(II) to Cu(I) does not occur, demonstrating that the Cu-*o*-Va is not reduced to Cu(I), but in the second scan, a reversible process around +0.06 evidences this process.

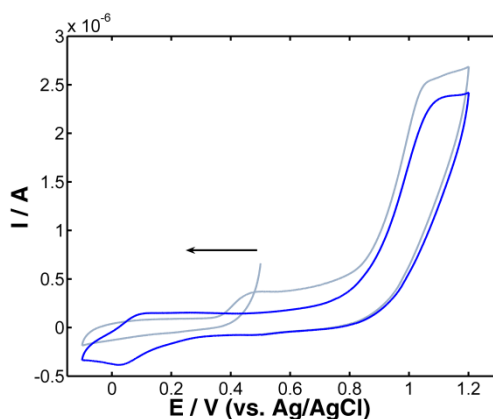


Figure 4.23 Cyclic voltammograms, performed in a  $10^{-4}$  M Cu-*o*-Va in 0.1 M TBAPF<sub>6</sub> solution in DMSO. Potential window from +0.30 V to -0.10 V starting at +0.50 V. Scan Rate 0.005 Vs<sup>-1</sup>.

Figure 4.24 shows the spectroelectrochemical responses obtained in the second experiment scanning the potential from +0.50 V to +1.20 V and back to -0.10 V, ending the experiment at the starting potential, +0.50 V. Both processes, the oxidation of the Cu-*o*-Va complex around +1.10 V, and the reversible process related to the Cu(II)/Cu(I) couple are clearly observed in the CV (Figure 4.24.a). It is remarkable that in this experiment, the contour plots registered in normal (Figure 4.24.b) and parallel (Figure 4.24.c) configuration provide exactly the same information, indicating that the two processes take place in solution. The main difference in both plots is the absorbance values obtained in the two configurations, with the parallel arrangement values being higher than the normal arrangement ones because of the difference in the optical pathways.

The electrochemical process is clearly described in this BSEC experiment. Initially, the Cu-*o*-Va complex is oxidized around +1.10 V, emerging a band around 510 nm related to this oxidation process. This band decreases in the backward scan due to a chemical reaction because no electrochemical changes are observed in the CV between +1.00 V and +0.40 V. In this potential region, the evolution of three different absorption bands is observed, one decreasing centered at 415 nm and another two increasing at 270 nm and 340 nm. These three absorption bands have to be ascribed to the chemical generation of the new Cu(II) complex that is next reduced to Cu(I) around +0.06 V, as indicated the

CV (Figure 4.24.a). This last electrochemical process can be observed spectroscopically at 285 nm (Figure 4.24.b and Figure 4.24c). This band decreases during the reduction of Cu(II) to Cu(I) and increases reversibly at the end of the scan when the initial potential is reached. Therefore, it can be undoubtedly assigned to this reversible process. Moreover, a last BSEC experiment was carried out right after the experiment showed in Figure 4.24, that corresponds with a cyclic voltammetry between +0.30 V and -0.10 V at 0.005 V·s<sup>-1</sup> in the same media.

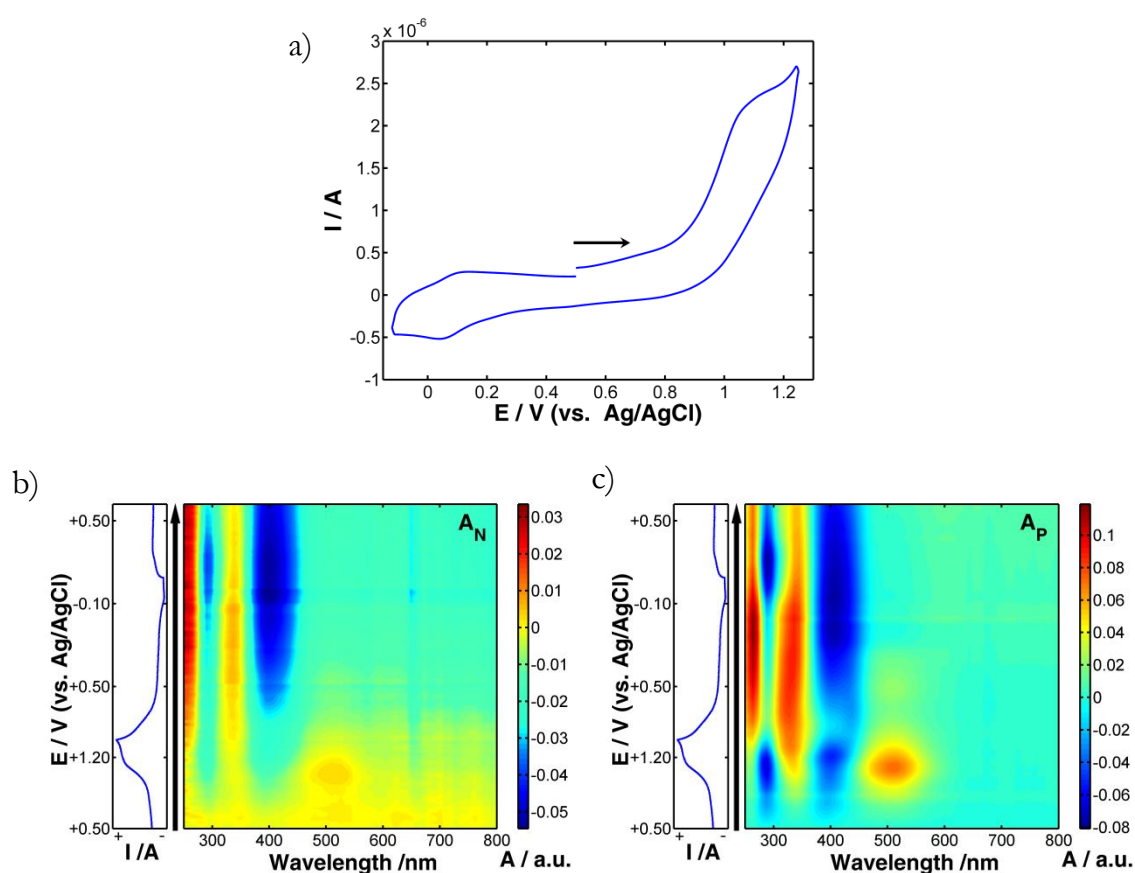


Figure 4.24 Spectroelectrochemistry responses obtained during the potential scan in a 10<sup>-4</sup> M Cu-*o*-Va and 0.1M TBAPF<sub>6</sub> solution in DMSO with. Potential window from -0.1 V to 1.2 V. Starting potential +0.50 V Scan rate: 0.005 V·s<sup>-1</sup> (a) Cyclic voltammogram starting in anodic direction. (b) Contour plot in normal arrangement. (c) Contour plot in parallel arrangement.

The comparison between the CV and the DCVA at 285 nm (Figure 4.25) evidences that both signals are related with the exactly the same process, in this case, the reversible reduction of Cu(II)/Cu(I) complex.

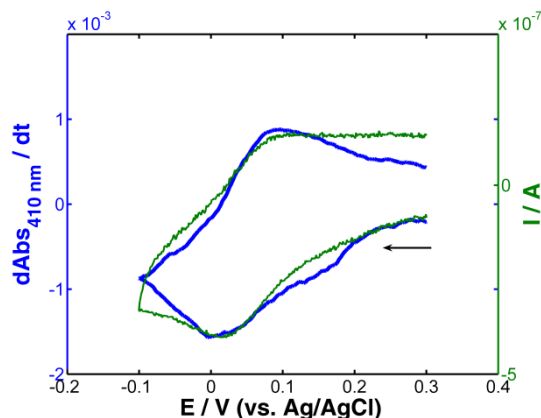


Figure 4.25 Cyclic voltammogram (green line) and derivative voltabsorptogram in parallel configuration. Potential was scanned from +0.30 V to -0.10 V at 0.005 V·s<sup>-1</sup> in a 10<sup>-4</sup> M Cu-*o*-Va in 0.1 M TBAPF<sub>6</sub> solution in DMSO.

The most intriguing point of these results is related to the new complex generated in solution. As it was explained above, changes in the spectra can be ascribed to a shifting of the position of the absorption bands of the complex during the oxidation process and the subsequent chemical reaction. A first hypothesis was related to the destruction of the Cu-*o*-Va complex to generate a new copper complex only with solvent molecules as ligand of the metallic center. To study this hypothesis, a spectroelectrochemical experiment was performed in a DMSO solution with 10<sup>-4</sup> M Cu<sup>2+</sup> and 0.1 M TBAPF<sub>6</sub>, scanning the potential between +0.30 and -0.10 V at 0.005 V·s<sup>-1</sup>. Figure 4.26 compares the contour plots in parallel configuration of this experiment (Figure 4.26.a) with that performed under exactly the same experimental conditions with the oxidized Cu-*o*-Va complex (Figure 4.26.b). From these results we can conclude that in both cases the Cu(II)/Cu(I) reversible reduction takes place. However, this reaction does not occur in the same spectral region. While the Cu(II) DMSO solution has an absorption band at 305 nm (Figure 4.26.a), the new complex shows a band at 285 nm (Figure 4.26.b) related to this reduction. Therefore, the destruction of the

Cu-*o*-Va complex should be discarded. In an attempt to identify the new complex formed during the oxidation, an exhaustive electrolysis of a Cu-*o*-Va solution was performed, applying a potential of +1.75 V during 600 s at 150  $\mu$ L of DMSO solution 0.013 M Cu-*o*-Va and 0.1 M TBAPF<sub>6</sub>.

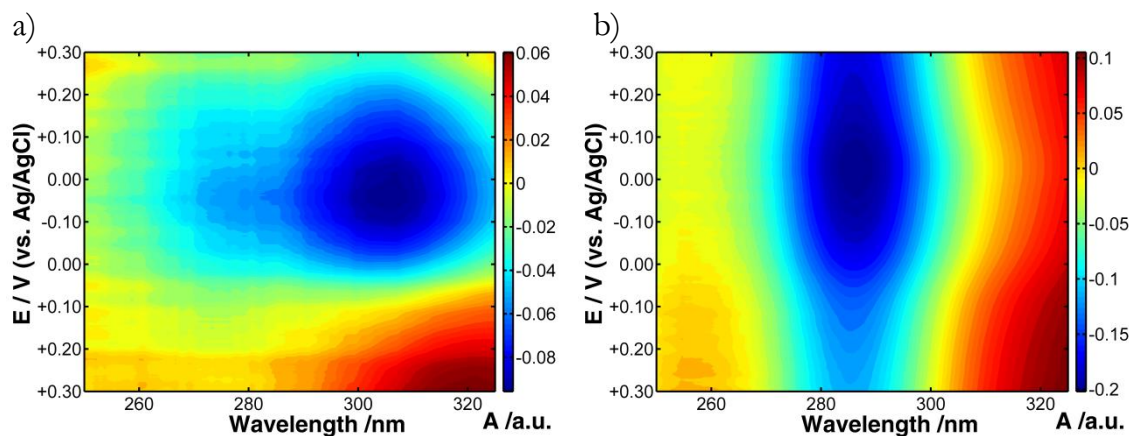


Figure 4.26 Spectroelectrochemistry responses obtained during the potential scan in a)  $10^{-3}$  M CuSO<sub>4</sub> and 0.1M TBAPF<sub>6</sub> solution in DMSO and b)  $10^{-4}$  M Cu-*o*-Va and 0.1M TBAPF<sub>6</sub> solution in DMSO. Potential window from -0.1 V to 0.3 V. Starting potential +0.30 V Scan rate:  $0.005 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$ .

Next, the reaction product of this electrolysis was analyzed by mass spectrometry (Figure 4.27). All the samples yield a mass corresponding to the *o*-Va ligand, without mass modification.

Therefore, and taking into account that the copper metallic center is not free after the irreversible Cu-*o*-Va oxidation, as it has been deduced from BSEC experiments, and considering that the ligand of the oxidized Cu-*o*-Va has not suffered any decomposition, as has been inferred from the mass spectrometry data, we have to assume that oxidized *o*-Va is still acting as ligand in the new complex. The shifting of the absorption bands related to this process suggests changes and, consequently, a reorganization of the complex structure after its irreversible oxidation. The new complex acquires a new configuration that favors the electrogeneration of the Cu(I) complex, which is not possible from the pristine Cu-*o*-Va complex.

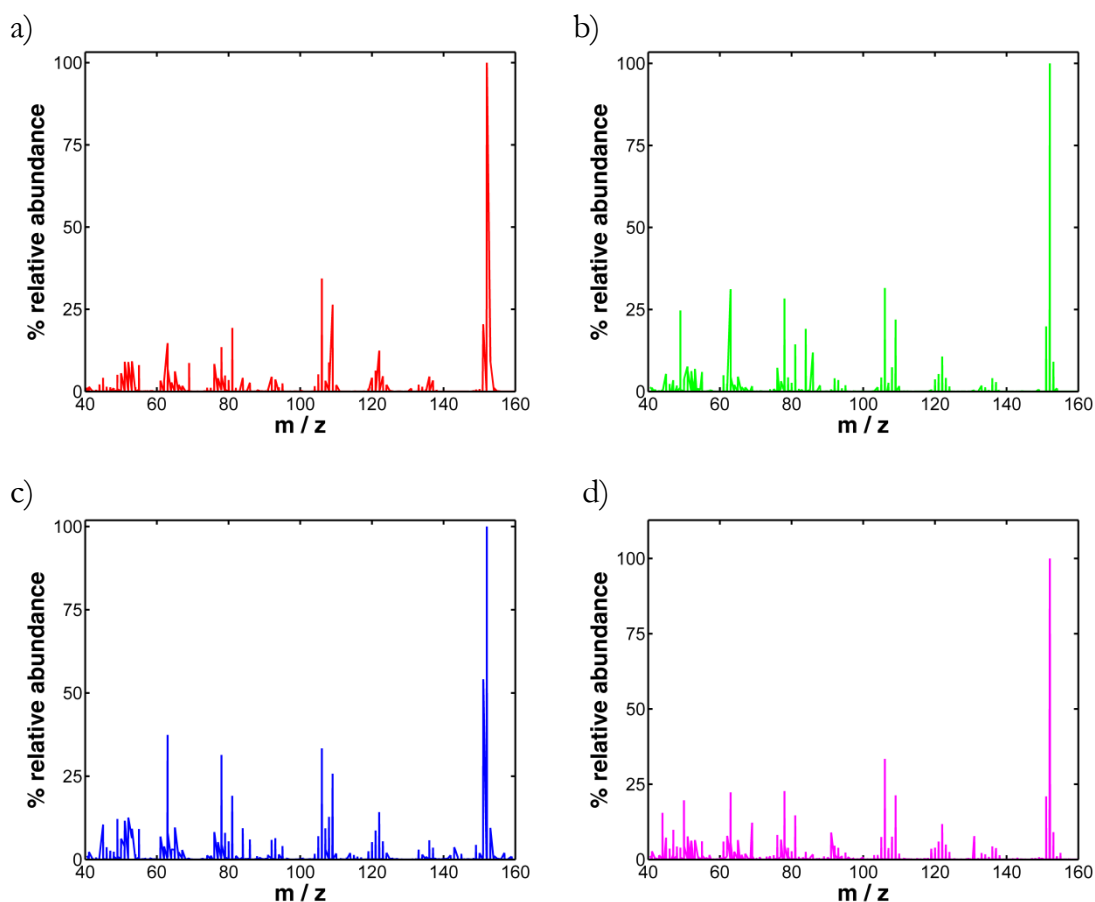


Figure 4.27 Mass spectra of a) *o*-Va, b) oxidized *o*-Va (*o*-Va<sup>+</sup>), c) Cu-*o*-Va complex and d) oxidized Cu-*o*-Va complex.

#### 4.3.4 Conclusions

A new bidimensional spectroelectrochemistry device has been developed. BSEC has demonstrated to be highly useful to unravel the extremely complex electrochemical mechanism of Cu-*o*-Va. This multiresponse technique has provided compelling information related to processes taking place both in solution and on the electrode surface. Summarizing, Cu-*o*-Va complex cannot be directly reduced to Cu(I) complex. This reduction reaction yields to Cu(0) electrodeposition on the electrode surface. On the other hand, oxidation of Cu-*o*-Va implies oxidation of the *o*-Va ligand, yielding a new Cu(II) complex that suffers some kind of structural change respect to the pristine Cu-*o*-Va. Once this new Cu(II)-*o*-Va complex has been generated, the reversible reduction Cu(II)/Cu(I) takes place.





## 4.4 Optical fiber spectroelectrochemistry in parallel arrangement.

### 4.4.1 Introduction

UV-Vis absorption spectroelectrochemistry has been successfully used to study a number of complex chemical systems providing important information about reaction mechanisms, electrical and optical properties of different materials, etc<sup>189,415,416</sup>. However, this hybrid technique has been scarcely used for quantitative analysis<sup>293,417</sup>, mainly because of the complexity of the spectroelectrochemical cells that typically are not easily mounted. When optically transparent electrodes (OTEs) are used in normal configuration devices, the optical path length is in the order of microns and the optical response can be poor for analytes with small absorption coefficients. This problem was circumvented by using long-optical path-way cells in which a light beam passes parallel to the electrode surface, sampling the solution adjacent to it<sup>326,418–420</sup>. In this way, the optical pathway coincides with the length of the working electrode. The main problem with this optical arrangement is how to ensure that the light beam goes parallel to the electrode surface. A possible solution was proposed by Anderson and Brewster<sup>421</sup> using a thin-layer spectroelectrochemical cell based on optical fibers but this approach has been scarcely used. Another common problem when OTEs are used is the small number of electrode materials with high conductivity and transparency. Recently, single walled carbon nanotubes (SWCNT) have been proposed as a satisfactory material to construct OTEs<sup>422</sup> owing to their extraordinary electrical and optical properties<sup>423,424</sup>.

On the other hand, SWCNT have been extensively used for electroanalytical purposes<sup>425–428</sup> because they exhibit very interesting electrocatalytic properties. Preparation of SWCNT is usually carried out by depositing a film of these nanotubes on the surface of a conductor<sup>429,430</sup>. Recently, our group has developed a simple methodology based on films prepared by filtering commercial SWCNT dispersed in organic solvents in absence of surfactants<sup>431</sup>. The SWCNT film is press-transferred from the filter to

an inert non-conductive polymer substrate. SWCNT electrodes constructed by this approach exhibit a good electrochemical performance avoiding the use of a conducting support. Therefore, the electrochemical response is intrinsically related to carbon nanotubes independently of any other factor in the electron transfer process.

Spectroelectrochemistry is an autovalidated technique because it provides two independent responses on the same analyte<sup>417</sup>, which is very useful for analytical purposes. Moreover, in the case of complex problems, it is a very interesting technique because in one single experiment two different kinds of information are obtained simultaneously and it is possible to use multivariate statistical techniques to obtain more reliable information. Therefore, it can be considered as a real-time technique with practical uses not only in qualitative but also in quantitative analysis.

The aim of this work was to describe a new long-optical-pathway spectroelectrochemical cell that uses two optical fibers, fixed on the cell, to conduct the light beam from the light source to the spectrometer, sampling the solution adjacent to the electrode surface. A great advantage of this device is the small volumes needed. The determination of catechol was selected as a proof of concept of the usefulness of this spectroelectrochemical cell usefulness for quantitative analysis and for the study of chemical mechanisms.

### *4.4.2 Experimental section*

#### *4.4.2.1 Chemicals and materials.*

All solutions were prepared with high-quality water (Milli-Q A10 system, Millipore, Bedford, USA). Buffer solutions were prepared from analytical reagent grade chemicals without further purification. The supporting electrolyte was a phosphate buffer solution (PBS) containing 0.5 M KCl (99%, Panreac) and 0.2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Merck) / NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Panreac), pH = 7. Catechol (99%, Acros Organics), hydroquinone (Merck) and HCl (37%, Acros Organics) were used as

received. All solutions were prepared fresh daily. The solution pH was measured with a pH-electrode (Crison). All experiments were performed at room temperature.

#### 4.4.2.2 Preparation of press-transfer SWCNT electrodes

SWCNT (Sigma-Aldrich), 1,2-dichloroethane (Fluka), 2 mm thick poly(methyl methacrylate) (PMMA; Maniplastic, S.L.), Teflon filters (pore size 0.1  $\mu\text{m}$ ; JWVP01300, Millipore Omnipore), silver conductive paint (Electrolube) for the electrical contacts, and epoxy protective overcoat (242-SB de ESL Europe) as insulator were used to produce the SWCNT electrodes.

Our group has developed a methodology to prepare SWCNT/PMMA electrodes<sup>431</sup>. Briefly, it is based on filtering an homogenized SWCNT dispersion in 1,2-dichloroethane. The films obtained on the Teflon filters are transferred to a piece of PMMA by pressure. Then, Teflon filter is removed slowly and carefully using tweezers. The electrical contacts are made using conductive silver paint that is electrically isolated with insulating paint. Detail information regarding the electrode preparation was published elsewhere<sup>339,431</sup>.

#### 4.4.2.3 Instrumentation

Cyclic voltammetry was carried out using a CHI730A potentiostat, mentioned in section 3.3.1.5. All experiments were performed using a three electrode configuration, using a SWCNT/PMMA electrode as working electrode, a gold wire as counter-electrode and a homemade Ag/AgCl/3M KCl as reference electrode.

Spectroelectrochemical experiments were performed in the UV-Visible spectral range (270-1000 nm) using a xenon light source, section 3.3.1.1, coupling the potentiostat with a QE65000 spectrometer, section 3.3.1.3.

### 4.4.3 Results and discussion

#### 4.4.3.1 UV-Vis Spectroelectrochemistry of catechol during dynamic experiments

The first part of this section 4.4 was centered in the study of the spectroelectrochemical behavior of catechol when potentiodynamic experiments were performed. The electro-oxidation of catechol is a quasi-reversible two-electron reaction in which 1,2-benzoquinone is generated<sup>432</sup>. Figure 4.28 shows the cyclic voltammogram in a  $10^{-3}$  M catechol solution in PBS buffer obtained by scanning the potential scanned -0.30 and +0.80 V at  $0.01 \text{ V s}^{-1}$ . This cyclic voltammogram shows only one anodic peak at +0.31 V related to the generation of o-benzoquinone during the oxidation scan and one cathodic peak at +0.07 V linked to the regeneration of catechol during the reduction scan<sup>432</sup>. Under these conditions the peak current ratio ( $I_p \text{ anodic}/I_p \text{ cathodic}$ ) is -1.23, indicating that lateral reactions take place and sub-products are generated during oxidation of catechol, probably dimerization reactions in which coupling of different anionic forms of catechol with o-benzoquinone occurs<sup>432,433</sup>.

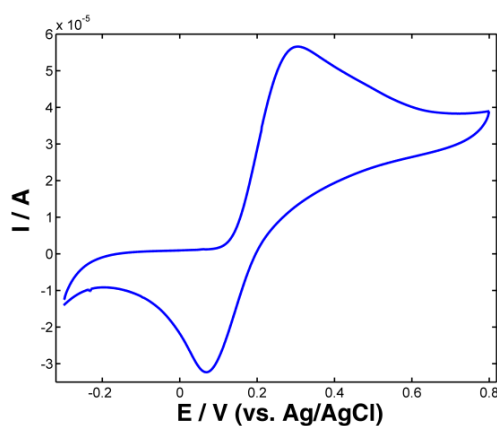


Figure 4.28 Cyclic voltammogram of oxidation of catechol  $10^{-3}$  M in PBS buffer media (pH = 7).  $E_{\text{initial}} = E_{\text{final}} = -0.30 \text{ V}$ ,  $E_{\text{vertex}} = +0.80 \text{ V}$ , scan rate =  $0.01 \text{ V s}^{-1}$ .

Spectra evolution, (Figure 4.29), obtained simultaneously during the electrochemical signal of the last figure, shows one absorption band centered at

390 nm and related to the electrogeneration of *o*-benzoquinone<sup>434</sup>. The spectrum of catechol at -0.30 V was used as reference spectrum. Inset of Figure 4.29 shows spectra at the initial ( $E_i = -0.30$  V), vertex ( $E_v = +0.80$  V) and final potentials ( $E_f = -0.30$  V). These spectra indicate that *o*-benzoquinone generated in the anodic scan is not completely consumed during the cathodic one, as is expected under semi-infinite diffusion conditions. The spectra at the vertex and final potential (Figure 4.29, inset) also exhibit an ill-defined shoulder between 450 and 650 nm. This band increases during the anodic scan and, far from decreasing during the cathodic one, it increases slightly. It is well-known that under some experimental conditions *o*-benzoquinone, the main oxidation product of catechol, is not very stable and can participate in hydroxylation and oxidative coupling reactions in which the final product is a melanin-type compound<sup>432,433</sup>. This shoulder that increases during the whole potential cycle, particularly during the anodic scan, can be attributed to soluble side products that can be observed using a long-optical path-way device.

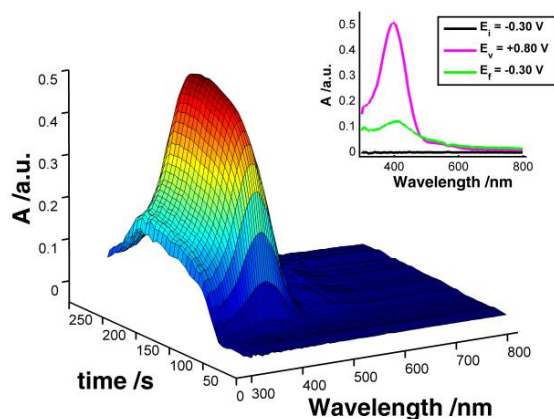


Figure 4.29 Spectra evolution of the oxidation of catechol  $10^{-3}$  M in PBS buffer media (Ph 7).  $E_{\text{initial}} = E_{\text{final}} = -0.30$  V,  $E_{\text{vertex}} = +0.80$  V, scan rate =  $0.01$  V $\cdot$ s $^{-1}$ . Inset: spectra at the initial, vertex and final potential

Voltabsorptogram at 390 nm (Figure 4.30) shows that oxidation of catechol starts at +0.14 V. From this potential onwards absorbance increases until the vertex potential is achieved (+0.80 V). During the backward scan, absorbance reaches a constant value because the solution very close to the electrode is

sampled, because 50- $\mu\text{m}$  diameter fibers are used. This steady state allows us to estimate the optical path length ( $l$ ) using the Lambert-Beer law, Ecuación 3.4. From the constant value of absorbance between +0.50 V and +0.30 V in the cathodic scan (0.52 a.u.), the concentration of catechol being  $10^{-3}$  M, and the extinction coefficient of *o*-benzoquinone at 390 nm ( $\epsilon = 1370 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  <sup>434</sup>) an experimental value of  $l = 0.3783 \pm 0.0006 \text{ cm}$  is calculated. Finally, the voltabsorptogram at 390 nm shows the reduction of the *o*-benzoquinone at +0.30 V, but this reduction step can be better observed using the derivative of the absorbance.

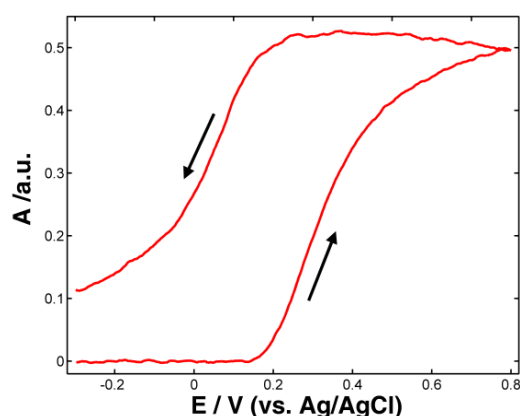


Figure 4.30 Voltabsorptogram at 390 nm of the oxidation of catechol  $10^{-3}$  M in PBS buffer media (pH 7).  $E_{\text{initial}} = E_{\text{final}} = -0.30 \text{ V}$ ,  $E_{\text{vertex}} = +0.80 \text{ V}$ , scan rate =  $0.01 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$ .

The derivative of absorbance respect to time at 390 nm (Figure 4.31) resembles the voltammogram with an anodic peak at +0.27 V and a cathodic one at +0.07 V, the peak absorbance ratio ( $dI_p \text{ anodic}/dI_p \text{ cathodic}$ ) being equal to 1.12. It is also observed that the anodic peak in the derivative voltabsorptogram (DCVA) at 390 nm is narrower than that of the cyclic voltammogram. Therefore, it can be deduced that the anodic peak in the cyclic voltammogram contains information related both to *o*-benzoquinone electrogeneration and to secondary compounds obtained in side reactions. However, the cathodic peak in both signals, cyclic voltammogram and DCVA at 390 nm, are probably related only to reduction of *o*-benzoquinone to catechol. From the optical signal we can

conclude that side reactions occur after the maximum of the anodic peak. Thus, selecting the current value at the peak (+0.31 V) allows the contribution of secondary products to be considered negligible.

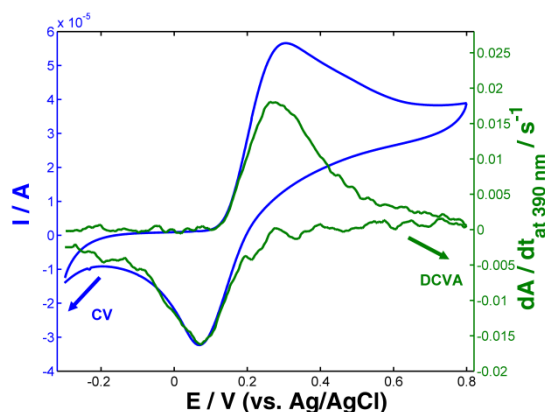


Figure 4.31 Comparison between derivative voltabsorptogram at 390 nm and cyclic voltammogram of the oxidation of catechol  $10^{-3}$  M in PBS buffer media (pH = 7).  $E_{\text{initial}} = E_{\text{final}} = -0.30$  V,  $E_{\text{vertex}} = +0.80$  V, scan rate =  $0.01 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$

#### 4.4.3.2 Voltabsorptometric determination of catechol

Not only mechanistic but also quantitative information can be extracted from spectroelectrochemical experiments. A set of catechol calibration samples were prepared between  $10^{-5}$  and  $10^{-3}$  M to evaluate the capability of spectroelectrochemistry to quantify catechol in PBS media (pH = 7). Cyclic voltammograms between  $-0.30$  V and  $+0.80$  V at  $0.01 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$  and the simultaneous UV-Vis spectra evolution were recorded for all samples. Integration time in spectroscopic data was 300 ms which shows the high temporal resolution of our spectroscopic device. Two univariate calibration curves were obtained. Taking the peak current in the anodic scan as response, we constructed the electrochemical calibration curve. As indicated above, absorbance between  $+0.50$  V and  $+0.30$  V in the cathodic scan remains almost constant (Figure 4.30). To improve the sensitivity of the spectroscopic signal, absorbance values at  $+0.40$  V during the cathodic scan at 390 nm were taken as response.

Regression parameters for the two univariate regression curves in the concentration range are shown in Table 4.1 obtained after outlier detection with least median of squares (LMS) regressions. Once outliers points were removed, a least squares (LS) regression model was used to predict the concentration of a test sample of catechol ( $C_{CA} = 3 \cdot 10^{-4}$  M).

**Table 4.1** Calibration parameters obtained for the determination of catechol in the concentration range from  $10^{-5}$  to  $10^{-3}$  M by UV-Vis voltabsorptometric spectroelectrochemistry

Method	Sensitivity	Intercept	Residual standard deviation ( $S_{YX}$ )	Coefficient of determination ( $R^2$ )
$I_p$	0.052 A M <sup>-1</sup>	$5.5 \times 10^{-6}$ A	$1.32 \times 10^{-6}$	0.9965
$A_{max}$	528.3 a.u. M <sup>-1</sup>	$4.6 \times 10^{-3}$ a.u.	$1.14 \times 10^{-2}$	0.9974
$A_{380-430nm}$	0.993 a.u. M <sup>-1</sup>	$1.2 \times 10^{-5}$ a.u.	$1.94 \times 10^{-5}$	0.9979

Methods indicated in the first column correlate peak current ( $I_p$ ), maximum absorbance  $A_{390nm}^{+0.40V,cat}$  ( $A_{max}$ ), and absorbance at +0.40V between 380 and 430 nm ( $A_{380-430nm}$ ) *versus* catechol concentration ( $C_{CA}$ ).

Table 4.2 shows the prediction of this value to determine the prediction capability of the two univariate curves. In the two cases the relative standard deviation (%RSD) for the estimations are lower than 10% and the coefficient of determination are highest than 0.99 indicating that the two calibration curves are adequate to determine catechol in PBS media. IUPAC suggests<sup>435</sup> that the trueness of analytical results should be guaranteed by validation experiments performed with a second and independent method. Spectroelectrochemistry, by definition, implies the simultaneous registration of two independent set of data, one obtained from electrochemistry and the other from spectroscopy. Therefore, as the two methods have demonstrated to be valid to determine catechol independently, the comparison of the predictions of both independent methods was performed. The following fitting parameters were obtained:  $a = 1.00 \pm 0.05$ , and  $b = [0.02 \pm 2.79] \times 10^{-5}$ , where  $a$  the slope of the regression and  $b$  the intercept. From this comparison we can assure that the two methods determine catechol without distinction. Furthermore, UV-Vis spectroelectrochemistry is an



autovalidated method of analysis, which is a very interesting property for quantitative analysis.

**Table 4.2** Concentration estimated from regression curves tabulated in Table 4.1

Method	$C_T = 3 \times 10^{-4} \text{ M}$	
	CI (M)	%RSD (n=6, $\alpha=0.05$ )
$I_p$	$[2.9 \pm 0.8] \times 10^{-4}$	9.6
$A_{\max}$	$[2.5 \pm 0.7] \times 10^{-4}$	9.4
$A_{380-430\text{nm}}$	$[2.4 \pm 0.7] \times 10^{-4}$	8.8

Methods indicated in the first column correlate peak current ( $I_p$ ),  $A_{390\text{nm}}^{+0.40\text{V,cat}}$  ( $A_{\max}$ ), and absorbance at +0.40V between 380 and 430 nm ( $A_{380-430\text{nm}}$ ) versus catechol concentration ( $C_{CA}$ ).

$C_T$  concentration of the test sample of catechol, CI confidence interval, %RSD relative standard deviation.

Spectroelectrochemical measurements performed in these experiments supply full spectra every 300 ms between 270 and 1100 nm. In view of all this spectral information, partial least squares regression (PLSR) can be carried out to ensure the reliability in the determination of catechol. Taking into account that side products were detected mainly from 450 to 650 nm, a spectral range between 380 and 430 nm was selected for quantitative purposes. To construct the multivariate model in this spectral range, spectra at +0.40 V in the cathodic scan was selected for all calibration standards as independent variables. Problems of multicollinearity related to the much higher number of predictors or independent variables (132 wavelengths) than the number of observations or dependent variables (6 samples) are resolved by using PLSR. A regression model was constructed selecting one latent variable whose loadings were related to the main oxidation product of catechol, *o*-benzoquinone. Figure 4.32 shows the loadings of this first latent variable compared with the spectra of a  $10^{-3} \text{ M}$  catechol solution at +0.40 V in the cathodic scan. As can be seen, the position of the maxima is exactly the same, the main difference being the band width, which is

narrower in the model constructed with PLSR. This indicates that the main absorption band centered at 390 nm includes information of more than one compound, probably secondary oxidation products, and univariate calibrations at wavelengths longer than 390 nm are not suitable for catechol determination. Multivariate calibration explains why 390 nm is an adequate wavelength to perform the univariate spectral calibration.

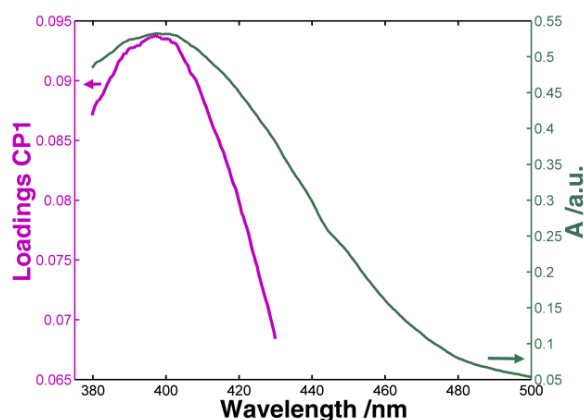


Figure 4.32 Comparison between spectrum  $10^{-3}$  M in PBS buffer media (pH 7) and loadings of the latent variable obtained after PLSR of the spectra from 380 to 430 nm for a catechol concentration set between  $10^{-5}$  and  $10^{-3}$  M. All signals are related to spectra at +0.40 V in the cathodic scan.

Regression parameters of the calibration model constructed by PLSR are shown in Table 4.1, improving slightly the determination coefficient. The catechol concentration of the same test sample of catechol was estimated from this PLSR model (Table 4.2), the confidence interval being similar to that calculated using univariate calibration and the RSD value being slightly lower (8.8%). Finally, we compared the estimations found with the electrochemical regression ( $I_p$ ) and PLSR regression ( $A_{380-430\text{ nm}}$ ) leading to unbiased models:  $a = 1.00 \pm 0.07$ , and  $b = [0.00 \pm 1.96] \times 10^{-5}$  corroborating that spectroelectrochemistry is an autovalidated method.

## 4.4.3.3 UV-Vis amperometric spectroelectrochemical study of catechol

Once the potentiodynamic study was performed and mechanistic and quantitative information related to catechol oxidation was obtained, it was possible to select the best electrical and spectroscopic parameters to carry out the amperometric determination of this compound.

Amperometric experiments were performed applying a potential of +0.80 V during 50 s, a potential high enough and a time long enough to be sure that an homogeneous concentration of *o*-benzoquinone is generated in the diffusion layer and in the solution contained between the illuminating and collector fibers. During these 50 s, spectra between 270 and 1100 nm were collected each 300 ms. Figure 4.33.a shows the evolution of the spectra of  $10^{-3}$  M catechol in PBS during one amperometric spectroelectrochemistry experiment.

One main absorption band is observed at 390 nm that yields an almost constant value of absorbance at the end of the experiment. A shoulder between 450 and 650 nm is observed in the last spectra of the experiment (Figure 4.33.a, inset). As was stated in voltabsorptometric experiments (Figure 4.29) this shoulder is related to soluble side products.

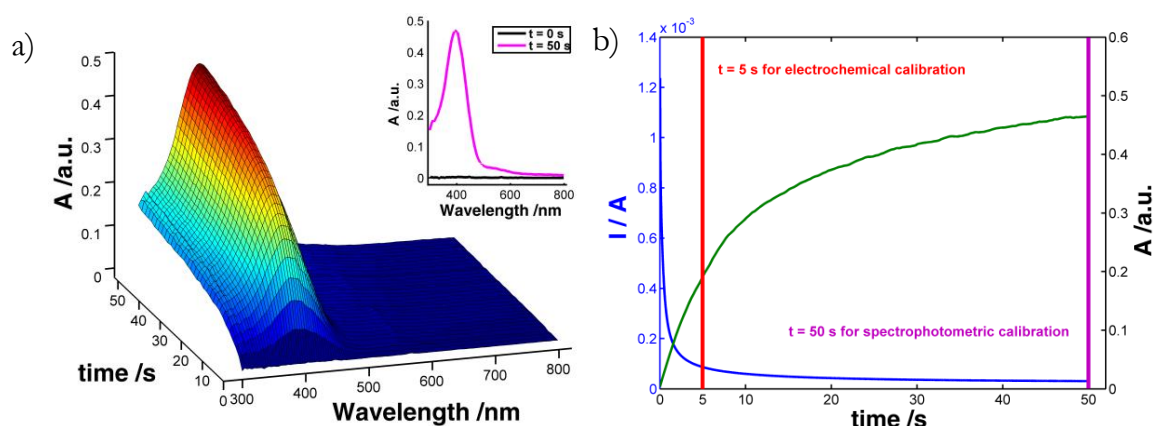


Figure 4.33 a) Spectra evolution and b) comparison between chronoamperogram and chronoabsorptogram at 390 nm where the time selected to univariate calibration is indicated. Inset spectra at the initial and final time of the amperometric experiment.  $C_{\text{catechol}} = 10^{-3}$  M in PBS buffer media (pH 7),  $t = 50$  s,  $E_{\text{applied}} = +0.80$  V.

The chronoamperogram and chronoabsorptogram at 390 nm are displayed together in Figure 4.33.b. We have selected the current at 5 s after starting the experiment as dependent variable in amperometric calibration of catechol because the electrical signal is practically constant in all cases. On the other hand, we took the absorbance values at 50 s as dependent variables in the absorptometric calibration of catechol to improve the sensitivity of the optical signal because the maximum amount of *o*-benzoquinone is contained between the two optical fibers at this time.

Table 4.3 shows the regression parameters of univariate calibrations. These parameters have been obtained with LS regression after removing outliers detected with LMS regression. As can be seen, good relationships between the two variables and catechol concentration were obtained, similar to those presented in Table 4.1 for potentiodynamic experiments. Next, the prediction of a test sample of catechol was carried out with the two univariate regression curves. In the two cases the relative standard deviation (%RSD) was around 10% indicating that both univariate calibration curves are adequate to determine catechol in PBS media.

**Table 4.3** Calibration parameters obtained for the determination of catechol in the concentration range from  $10^{-5}$  to  $10^{-3}$  M by UV/Vis amperometric spectroelectrochemistry

Method	Sensitivity	Intercept	Residual standard deviation ( $S_{YX}$ )	Coefficient of determination ( $R^2$ )
$I_p$	0.096 A M <sup>-1</sup>	$8.6 \times 10^{-6}$ A	$2.46 \times 10^{-6}$	0.9946
$A_{\max}$	465.3 a.u. M <sup>-1</sup>	$8.4 \times 10^{-3}$ a.u.	$1.27 \times 10^{-2}$	0.9959
$A_{380-430\text{nm}}$	0.998 a.u. M <sup>-1</sup>	$2.8 \times 10^{-6}$ a.u.	$1.81 \times 10^{-5}$	0.9982

Methods indicated in the first column correlate peak current ( $I_{5s}$ ), maximum absorbance  $A_{390\text{nm}}^{50\text{s}}$  ( $A_{\max}$ ), and absorbance at +0.40 V between 380 and 430 nm ( $A_{380-430\text{nm}}$ ) versus catechol concentration ( $C_{CA}$ ).

Under these working conditions, the detection limit of this spectroelectrochemical method was calculated with both sets of data. The minimum detectable concentration of catechol for the electrochemical calibration was  $2.9 \times 10^{-5}$  M ( $n = 4$ ,  $\alpha = 0.05$ ,  $\beta = 0.05$ ) and for the spectrophotometric calibration it was  $3.6 \times 10^{-5}$  M ( $n = 4$ ,  $\alpha = 0.05$ ,  $\beta = 0.05$ ). The range of linearity was also estimated for both sets of data. A linear range for catechol from  $2.9 \times 10^{-5}$  M to  $10^{-3}$  M was obtained for electrochemical calibration, taking the values of current after 5 s of starting catechol oxidation. On other side, a linear range for catechol from  $3.6 \times 10^{-5}$  to  $10^{-3}$  M was achieved for spectrophotometric calibration, taking the values of absorbance at 390 nm 50 s during taking the values of absorbance at 390 nm after 50 s during the catechol oxidation.

As in the voltammetric experiments, the comparison between estimations obtained with the two univariate regression curves was performed and we concluded that the models are unbiased ( $a = 1 \pm 0.12$ , and  $b = [0.05 \pm 3.01] \times 10^{-5}$ ).

The multivariate model was constructed by PLSR between 380 and 430 nm, using the spectra at the end of the experiment as independent variables. Regression parameters are summarized in Table 4.3 and confidence interval in Table 4.4.

In the case of the amperometric spectroelectrochemistry detection, the determination coefficient is improved using multivariate calibration as is the residual standard deviation. One of the main advantages of real-time spectroelectrochemistry using diode array spectrometers is the possibility of selecting the best wavelength range to estimate a test value, thereby improving the reliability of the results obtained with typical univariate calibrations.

**Table 4.4** Concentration estimated from regression curves tabulated in Table 4.3

Method	$C_T = 3 \times 10^{-4} \text{ M}$	
	CI (M)	%RSD (n=6, $\alpha=0.05$ )
$I_{5s}$	$[3.0 \pm 0.8] \times 10^{-4}$	9.5
$A_{\max}$	$[2.9 \pm 0.7] \times 10^{-4}$	10.2
$A_{380-430\text{nm}}$	$[2.9 \pm 0.7] \times 10^{-4}$	6.9

Methods indicated in the first column correlate peak current ( $I_{5s}$ ),  $A_{390\text{nm}}^{+0.40\text{V,cat}}$  ( $A_{\max}$ ), and absorbance at +0.40V between 380 and 430 nm ( $A_{380-430\text{nm}}$ ) *versus* catechol concentration ( $C_{CA}$ ).

$C_T$  concentration of the test sample of catechol, CI confidence interval, %RSD relative standard deviation.

#### 4.4.3.4 Study of probable interfering species.

Catechol and hydroquinone are two isomers of dihydroxybenzene that usually coexist in environmental samples. Both isomers are considered as pollutants due to their toxicity and persistence<sup>436–438</sup>. Nevertheless, they can coexist in solution owing to their similar chemical structure. For this reason, the simultaneous determination of these two phenolic compounds is very usual but not easy.

The electrochemical signals of these two dihydroxybenzene isomers have been registered by linear voltammetry between 0.00 and +1.00 V at 0.01 V·s<sup>-1</sup> (Figure 4.34.a). Three different solutions were analyzed, two of them with the pure components (catechol or hydroquinone) and the other one is a mixture of these two isomers. As can be seen (Figure 4.34.a), the voltammograms are highly overlapped, rendering electrochemical determination in mixture samples almost impossible unless a suitable modification of the working electrode is performed<sup>133,436,437,439,440</sup>.

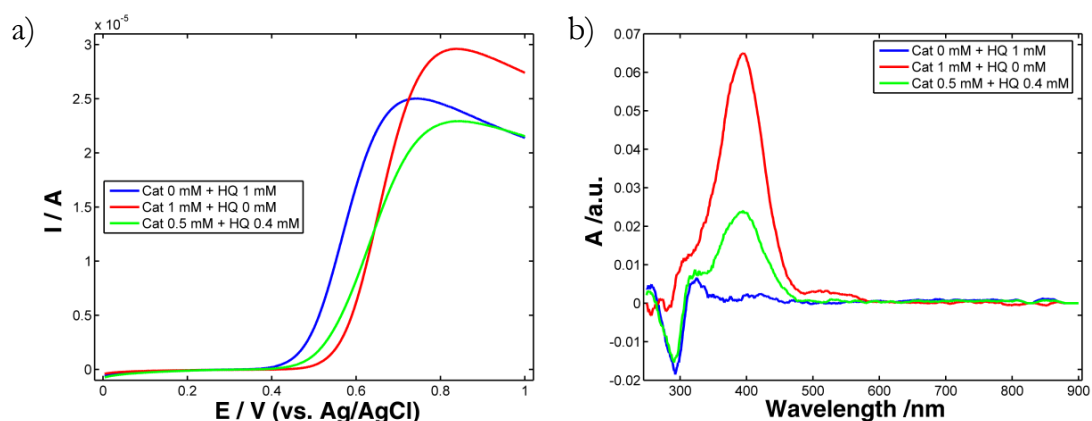


Figure 4.34 a) Voltammograms and b) spectra of catechol  $10^{-3}$  M (*blue line*), hydroquinone  $10^{-3}$  M (*red line*), and a mixture of catechol  $5 \times 10^{-4}$  M and hydroquinone  $4 \times 10^{-4}$  M in 0.01 M HCl and 0.1 M KCl (pH 2) at +1.00 V.  $E_{\text{initial}} = 0.00$  V,  $E_{\text{final}} = +1.00$  V, scan rate =  $0.01 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$

However, spectroscopic signals, recorded simultaneously to the linear voltammograms shown in Figure 4.34.a, reveal significant spectral differences for solutions of catechol, hydroquinone and a mixture of both reactants. Figure 4.34.b displays spectra registered at vertex potential, +1.00 V, for the three solutions. Whereas the spectrum of catechol exhibits a maximum of absorbance around 390 nm, the spectrum of hydroquinone shows a minimum of absorbance at 288 nm related to consumption of hydroquinone during its oxidation. On the other hand, the mixture of catechol and hydroquinone exhibits the maximum at 390 nm and the minimum at 288 nm.

As was demonstrated before, dynamic spectroelectrochemical experiments provide more information than a single measurement at a fixed potential. Accordingly, these experiments with a suitable analysis of the data can be very useful to determinate catechol with hydroquinone as an interfering species. Seven calibration samples were prepared with concentrations of catechol and hydroquinone between 0 and  $10^{-3}$  M in HCl 0.01 M and 0.1 M KCl (pH 2), Table 4.5. Usually, electrochemical methods are used to determine catechol in presence of a constant amount of hydroquinone. Here, all solutions were spiked with different concentrations of hydroquinone to show the capability of

spectroelectrochemistry to quantify a compound in presence of an unknown interfering compound. Amperometric experiments were performed applying a potential of +1.00 V for 100 s.

Table 4.5 Standards solutions of catechol in presence of hydroquinone used in PLSR analysis of this mixture.

Sample	$C_{\text{catechol}}$ (M)	$C_{\text{hydroquinone}}$ (M)
1	$8 \times 10^{-4}$	$6 \times 10^{-4}$
2	$6 \times 10^{-4}$	$3 \times 10^{-4}$
3	$4 \times 10^{-4}$	$2 \times 10^{-4}$
4	$2 \times 10^{-4}$	$7 \times 10^{-4}$
5	$1 \times 10^{-4}$	$5 \times 10^{-4}$
6	0	$1 \times 10^{-4}$
7	$1 \times 10^{-4}$	0
T	$5 \times 10^{-4}$	$4 \times 10^{-4}$

As was expected, determination from the electrical signal was impossible because of the overlapping of the current. Random responses were obtained with a  $R^2 = 0.4110$ . Therefore, only spectroscopic signal is useful for this case.

As it was established before in the spectroelectrochemical determination of catechol, both with amperometric and voltabsorptometric experiments, multivariate analysis of the data improves the calibration results. For this reason, the analysis of this complex system was carried out with multivariate calibration using PLSR as chemometric tool.

The multivariate model was constructed using the spectra between 280 and 600 nm at the end of the experiment, after applying +1.00 V for 100 s, as independent variables. The regression model has been performed selecting two



latent variables that are related to the oxidized catechol and the hydroquinone, as can be deduced from the loadings plotted in Figure 4.35. Prediction of the concentration of a test sample with a concentration  $5 \cdot 10^{-4}$  M of catechol in presence of hydroquinone  $4 \cdot 10^{-4}$  M was performed and afforded a value of  $[4.9 \pm 0.2] \times 10^{-4}$  M for catechol (%RSD = 1.3).

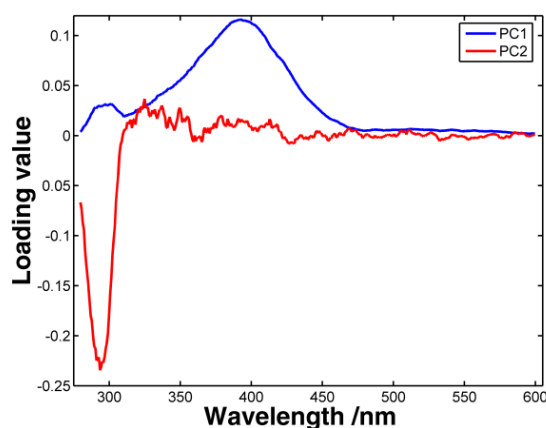


Figure 4.35 Loadings plot the two latent variables after partial least squares regression (PLSR) of a set of seven calibration samples with concentrations of catechol and hydroquinone between 0 and  $10^{-3}$  M in 0.01 M HCl (pH 2).  $E_{\text{applied}} = +1.00$  V,  $t = 100$  s.

Therefore, we have demonstrated that spectroelectrochemistry can be used for the resolution of complex samples. The main advantage of spectroelectrochemistry is that is very difficult to find two compounds that show the same spectra and the same voltammogram. Nevertheless, even if the voltammogram and the spectra were very similar, chemometrics tools such as PARAFAC could be used to resolve the mixture<sup>441</sup>.

#### 4.4.4 Conclusions

A new long-optical-pathway spectroelectrochemical cell was presented in this work. Although the cell was used with press-transferred SWCNT working electrodes to improve the determination of catechol, it can be used with any other type of electrode material depending on the application. The fiber-optic spectroelectrochemical cell was demonstrated to be very useful for both mechanistic studies and quantitative analysis. Voltabsorptometric experiments

demonstrated that the oxidation of catechol produces *o*-benzoquinone concomitantly with the generation of soluble side products. Multivariate calibration provides very valuable information to select the best wavelength to perform the univariate absorptometric calibration, obtaining more reliable results in the amperometric spectroelectrochemistry determination of catechol. Calibration curves performed with the electrical and optical signal are valid to quantify catechol. It was demonstrated that spectroelectrochemistry was autovalidated analytical method. Spectroelectrochemistry was demonstrated to be very useful to resolve complex mixtures, even without information about the amounts of interfering compounds. The use of a simple cell design proposed in this section, which allows us to obtain a good optical sensitivity with high time resolution, opens a new door to spectroelectrochemistry for quantitative analysis.

## 5 CONCLUSIONS



The main objective of this work has been to develop new set-ups, cells and analytical devices for UV-Vis spectroelectrochemistry in order to shed more light on complex electrochemical processes that are difficult to be fully understood without this multiresponse technique.

The conclusions extracted from each section have been specifically explained in detail above. Nevertheless, the main conclusions obtained from the results obtained in this Thesis can be summarized as follows:

- ◆ UV-Vis spectroelectrochemistry has been shown to be a useful and powerful technique to elucidate and follow complex reaction mechanisms, allowing us to observe and study different processes taking place at the same time during the electrode reaction.
- ◆ UV-Vis spectroelectrochemistry has also demonstrated to be very useful in quantitative analysis, being an autovalidated analytical method.
- ◆ The spectroelectrochemical devices and setups developed in this Thesis have been validated with different reference systems, demonstrating their good performance, reliability and utility.
- ◆ Spatial scanning spectroelectrochemistry has allowed us to obtain information about the distribution of the reaction products at different distances from the electrode surface. This technique has also provided time resolved spectra at a fixed position of the light beam respect to the interface. In this way it has been possible to obtain a higher reproducibility in the light beam position between different spectroelectrochemistry experiments.
- ◆ Bidimensional spectroelectrochemistry has been demonstrated to be an effective technique to study phenomena that take place in an electrochemical process both in solution and on the electrode surface, allowing the discrimination of between diffusive and surface processes. The double spectroscopic information provided by this technique, in

normal and parallel arrangement, has revealed the nature of the processes occurring at the interface because of the higher amount of information obtained. Undoubtedly, the conclusions extracted from a bidimensional spectroelectrochemistry experiment are more reliable than those obtained from techniques that employ only one spectroscopic arrangement.

- ◆ Spatial scanning spectroelectrochemistry has been used for studying the ion transfer of cation  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  from the aqueous phase to the organic phase and has allowed us to follow the evolution of the distribution of this ion in the two immiscible phases.
- ◆ Spatial scanning spectroelectrochemistry has detected the generation of Pd clusters in the aqueous phase during the electrodeposition of Pd NPs at the L/L interface.
- ◆ Spectroelectrochemistry in parallel configuration has been demonstrated to be very useful to demonstrate the antioxidant effect of *o*-Va.
- ◆ Bidimensional spectroelectrochemistry indicates that the electrochemistry of Cu-*o*-Va is not a simple process. This complex cannot be reduced to Cu(I) but to Cu(0) that is deposited on the electrode surface. However, when the oxidation of the complex takes place, a new complex is generated that can be reduced to Cu(I).
- ◆ The fiber-optic spectroelectrochemical cell has proved to be very useful not only for mechanistic studies but also for quantitative analysis. The small amount of solution required by this cell reduces drastically the sample size in the analysis.
- ◆ Spectroelectrochemistry can be used to resolve quantitatively complex mixtures that cannot be analyzed only by electrochemistry.

Chemometric tools are very useful to handle the information obtained with this multiresponse technique.

- ◆ The work shown in this Thesis is only a presentation of new techniques and devices that should be improved. However, this new spectroelectrochemistry approach has proven to be very useful to study chemical systems of very different nature, in very different fields.





6 BIBLIOGRAPHY



- (1) Guo, J.; Tokimoto, T.; Othman, R.; Unwin, P. R. Formation of Mesoscopic Silver Particles at Micro- and Nano-Liquid/liquid Interfaces. *Electrochem. commun.* **2003**, *5* (12), 1005–1010.
- (2) Trojánek, A.; Langmaier, J.; Samec, Z. Random Nucleation and Growth of Pt Nanoparticles at the Polarised Interface between Two Immiscible Electrolyte Solutions. *J. Electroanal. Chem.* **2007**, *599* (2), 160–166.
- (3) Uehara, A.; Hashimoto, T.; Dryfe, R. A. W. Au Electrodeposition at the Liquid-Liquid Interface: Mechanistic Aspects. *Electrochim. Acta* **2014**, *118*, 26–32.
- (4) Toth, P. S.; Rodgers, A. N. J.; Rabiú, A. K.; Dryfe, R. A. W. Electrochemical Activity and Metal Deposition Using Few-Layer Graphene and Carbon Nanotubes Assembled at the Liquid–liquid Interface. *Electrochem. commun.* **2015**, *50*, 6–10.
- (5) Shao, Y.; Mirkin, M. V.; Rusling, J. F. Liquid/Liquid Interface as a Model System for Studying Electrochemical Catalysis in Microemulsions. Reduction of Trans -1,2-Dibromocyclohexane with Vitamin B 12. *J. Phys. Chem. B* **1997**, *101* (16), 3202–3208.
- (6) Lahtinen, R.; Johans, C.; Hakkarainen, S.; Coleman, D.; Kontturi, K. Two-Phase Electrocatalysis by Aqueous Colloids. *Electrochem. commun.* **2002**, *4* (6), 479–482.
- (7) Trojánek, A.; Langmaier, J.; Samec, Z. Electrocatalysis of the Oxygen Reduction at a Polarised Interface between Two Immiscible Electrolyte Solutions by Electrochemically Generated Pt Particles. *Electrochem. commun.* **2006**, *8*, 475–481.
- (8) Rodgers, A. N. J.; Booth, S. G.; Dryfe, R. A. W. Particle Deposition and Catalysis at the Interface between Two Immiscible Electrolyte Solutions (ITIES): A Mini-Review. *Electrochem. commun.* **2014**, *47*, 17–20.
- (9) Nia, R. P. Electrocatalysis at Liquid / Liquid Interfaces, École Polytechnique Fédérale de Lausanne, 2010, Vol. 4620.
- (10) Gavach, C.; Seta, P.; Henry, F. A Study of the Ionic Transfer across an Aqueous Solution Liquid Membrane Interface by Chronopotentiometric and Impedance Measurements. *Bioelectrochemistry Bioenerg.* **1974**, *1* (3-4), 329–342.
- (11) Beattie, P. D.; Wellington, R. G.; Girault, H. H. Cyclic Voltammetry for Assisted Ion Transfer at an ITIES. *J. Electroanal. Chem.* **1995**, *396*, 317–323.
- (12) Kontturi, K.; Manzanares, J. A.; Murtomäki, L. Effect of Concentration Polarization on the Current-Voltage Characteristics of Ion Transfer across ITIES. *Electrochim. Acta* **1995**, *40* (18), 2979–2984.
- (13) Spataru, T.; Spataru, N.; Bonciocat, N.; Luca, C. Potentiometric Investigation of the Effect of the pH on the Ionic Transfer of Some Amino Acids at the Interface between Two Immiscible Electrolyte Solutions. *Bioelectrochemistry* **2004**, *62* (1), 67–71.
- (14) O'Sullivan, S.; Arrigan, D. W. M. Electrochemical Behaviour of Myoglobin at an Array of Microscopic Liquid-Liquid Interfaces. *Electrochim. Acta* **2012**, *77*, 71–76.
- (15) Volkov, A. G.; Gugeshashvili, M. I.; Deamer, D. W. Energy Conversion at Liquid/liquid Interfaces: Artificial Photosynthetic Systems. *Electrochim. Acta* **1995**, *40* (18), 2849–2868.
- (16) Nernst, W.; Riesenfel, E. H. Ueber Elektrolytische Erscheinungen an Der Grenzfläche Zweier Lösungsmittel. *Ann. Phys.* **1901**, *313* (7), 600–608.
- (17) Rieseafeld, E. H. Konzentrationsketten Mit Nichtmischbaren. *Ann. Phys.* **1902**, *8*, 616–624.
- (18) Gouy, M. Sur La Constitution de La Charge Électrique À La Surface D'un Électrolyte. *J. Phys. Théorique Appliquée* **1910**, *9* (1), 457–468.

- (19) Chapman, D. L. LI. A Contribution to the Theory of Electrocapillarity. *Philos. Mag. Ser. 6* **1913**, 25 (148), 475–481.
- (20) Verwey, E. J. W.; Niessen, K. F. XL. The Electrical Double Layer at the Interface of Two Liquids. *Philos. Mag. Ser. 7* **1939**, 7 (28:189), 435–446.
- (21) Gavach, C.; Mlodnicka, T.; Gustalla, J. C. R. Sur La Possibilite de Phenomenes de Surtension a L'interface Entre Solutions Organiques et Solutions Aqueuses. *Acad. Sci.* **1968**, 168, 1196–1199.
- (22) Koryta, J. Electrochemical Polarization Phenomena at the Interface of Two Immiscible Electrolyte Solutions. *Electrochim. Acta* **1979**, 24, 293–300.
- (23) Koryta, J.; Březina, M.; Hofmanová, A.; Homolka, D.; Hung, L. Q.; Khalil, W.; Mareček, V.; Samec, Z.; Sen, S. K.; Vanýsek, P.; Weber, J. A New Model of Membrane Transport: Electrolysis at the Interface of Two Immiscible Electrolyte Solutions. *Bioelectrochemistry Bioenerg.* **1980**, 7, 61–68.
- (24) Koryta, J. Electrochemical Polarization Phenomena at the Interface of Two Immiscible Electrolyte Solutions-III. Progress since 1983. *Electrochim. Acta* **1983**, 33 (2), 189–197.
- (25) Koryta, J. Electrochemistry of Liquid Membranes: Interfacial Aspects. *Electrochim. Acta* **1987**, 32 (3), 419–424.
- (26) Samec, Z.; Mareček, V.; Koryta, J.; M.W., K. Investigation of Ion Transfer across the Interface between Two Immiscible Electrolyte Solutions by Cyclic Voltammetry. *J. Electroanal. Chem.* **1977**, 83, 393–397.
- (27) Samec, Z.; Mareček, V.; Weber, J. Charge Transfer between Two Immiscible Electrolyte Solutions Part II. the Investigation of Cs<sup>+</sup> Ion Transfer across the Nitrobenzene/Water Interface by Cyclic Voltammetry with IR Drop Compensation. *J. Electroanal. Chem.* **1979**, 100, 841–852.
- (28) Samec, Z.; Mareček, V.; Weber, J. Detection of an Electron Transfer Across the Interface between Two Immiscible Electrolyte Solutions by Cyclic Voltammetry with Four-Electrode System. *J. Electroanal. Chem.* **1977**, 96, 245–247.
- (29) Johans, C.; Kontturi, K.; Schiffrin, D. J. Nucleation at Liquid/liquid Interfaces: Galvanostatic Study. *J. Electroanal. Chem.* **2002**, 526, 29–35.
- (30) Gründer, Y.; Ho, H. L. T.; Mosselmans, J. F. W.; Schroeder, S. L. M.; Dryfe, R. A. W. Inhibited and Enhanced Nucleation of Gold Nanoparticles at the water|1,2-Dichloroethane Interface. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, 13 (34), 15681–15689.
- (31) Platt, M.; Dryfe, R. A. W.; Roberts, E. P. L. Structural and Electrochemical Characterisation of Pt and Pd Nanoparticles Electrodeposited at the Liquid/liquid Interface. *Electrochim. Acta* **2004**, 49 (22-23), 3937–3945.
- (32) Fantini, S.; Clohessy, J.; Gorgy, K.; Fusalba, F.; Johans, C. Influence of the Presence of a Gel in the Water Phase on the Electrochemical Transfer of Ionic Forms of B-Blockers across a Large water|1,2-Dichloroethane Interface. **2003**, 18, 251–257.
- (33) Sefer, B.; Gulaboski, R.; Mirčeski, V. Electrochemical Deposition of Gold at Liquid–liquid Interfaces Studied by Thin Organic Film-Modified Electrodes. *J. Solid State Electrochem.* **2011**, 16 (7), 2373–2381.
- (34) Mareček, V.; Samec, Z. Determination of Calcium, Barium and Strontium Ions by Differential Pulse Stripping Voltammetry at a Hanging Electrolyte Drop Electrode. *Anal. Chim. Acta* **1983**, 151 (C), 265–269.
- (35) Kakutani, T.; Osakai, T.; Senda, M. Potential-Step Chronoamperometric Study of Ion Transfer at the Water/nitrobenzene Interface. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1983**, 56 (4), 991–996.

- (36) Homolka, D.; Mareček, V. Charge Transfer between Two Immiscible Electrolyte Solutions. Part VI. Polarographic and Voltammetric Study of Picrate Ion Transfer across the Water/nitrobenzene Interface. *J. Electroanal. Chem.* **1980**, *112* (1), 91–96.
- (37) Osakai, T.; Kakutani, T.; Senda, M. A. C. Polarographic Study of Ion Transfer at the Water/nitrobenzene Interface. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1984**, *57* (2), 370–376.
- (38) Samec, Z.; Mareček, V.; Weber, J.; Homolka, D. Charge Transfer between Two Immiscible Electrolyte Solutions. Part VII. Convolution Potential Sweep Voltammetry of Cs<sup>+</sup> Ion Transfer and of Electron Transfer between Ferrocene and Hexacyanoferrate (III) Ion across the Water/nitrobenzene Interface. *J. Electroanal. Chem.* **1981**, *126* (1-3), 105–119.
- (39) Beattie, P. D.; Delay, A.; Girault, H. H. Investigation of the Kinetics of Ion and Assisted Ion Transfer by the Technique of Ac Impedance of the Micro-ITIES. *Electrochim. Acta* **1995**, *40* (18), 2961–2969.
- (40) Trojánek, A.; Krtíl, P.; Samec, Z. Quasi-Elastic Laser Light Scattering from Thermally Excited Capillary Waves on the Polarised water/1,2-Dichloroethane Interface. *Electrochem. commun.* **2001**, *3* (11), 613–618.
- (41) Webster, R. D.; Beaglehole, D. In Situ Electrochemical–ellipsometry Studies of Charge-Transfer Processes at the Liquid/liquid Interface. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2000**, *2* (24), 5660–5666.
- (42) Conboy, J. C.; Richmond, G. L. Examination of the Electrochemical Interface between Two Immiscible Electrolyte Solutions by Second Harmonic Generation. *J. Phys. Chem. B* **1997**, *101* (6), 983–990.
- (43) Crawford, M. J.; Frey, J. G.; VanderNoot, T. J.; Zhao, Y. Investigation of Transport across an Immiscible Liquid/liquid Interface. Electrochemical and Second Harmonic Generation Studies. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **1996**, *92* (8), 1369–1373.
- (44) Luca, A. A. T.; Hebert, P.; Brevet, P. F.; Girault, H. H. Surface Second-Harmonic Generation at Air/solvent and Solvent/solvent Interfaces. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **1995**, *91* (12), 1763–1768.
- (45) Du, Q.; Freysz, E.; Shen, Y. R. Surface Vibrational Spectroscopic Studies of Hydrogen Bonding and Hydrophobicity. *Science*. **1994**, *264*, 826–828.
- (46) Scatena, L. F.; Brown, M. G.; Richmond, G. L. Water at Hydrophobic Surfaces: Weak Hydrogen Bonding and Strong Orientation Effects. *Science*. **2001**, *292*, 908–912.
- (47) Richmond, G. L. Structure and Bonding of Molecules at Aqueous Surfaces. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2001**, *52*, 357–389.
- (48) Pan, Y.; Gao, J.; Zhang, B.; Zhang, X.; Xu, B. Colloidosome-Based Synthesis of a Multifunctional Nanostructure of Silver and Hollow Iron Oxide Nanoparticles. *Langmuir* **2010**, *26* (6), 4184–4187.
- (49) Olaya, A. J.; Schaming, D.; Brevet, P. F.; Nagatani, H.; Zimmermann, T.; Vanicek, J.; Xu, H. J.; Gros, C. P.; Barbe, J. M.; Girault, H. H. Self-Assembled Molecular Rafts at Liquid|liquid Interfaces for Four-Electron Oxygen Reduction. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (1), 498–506.
- (50) Hatay, I.; Su, B.; Méndez, M. a.; Corminboeuf, C.; Khoury, T.; Gros, C. P.; Bourdillon, M.; Meyer, M.; Barbe, J. M.; Ersoz, M.; Zálaiš, S.; Samec, Z.; Girault, H. H. Oxygen Reduction Catalyzed by a Fluorinated Tetrphenylporphyrin Free Base at Liquid/Liquid Interfaces. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132* (39), 13733–13741.

- (51) Luo, K.; Schroeder, S. L. M.; Dryfe, R. A. W. Formation of Gold Nanocrystalline Films at the Liquid/liquid Interface: Comparison of Direct Interfacial Reaction and Interfacial Assembly. *Chem. Mater.* **2009**, *21* (18), 4172–4183.
- (52) Ibañez, D.; Plana, D.; Heras, A.; Fermín, D. J.; Colina, Á. Monitoring Charge Transfer at Polarizable Liquid/liquid Interfaces Employing Time-Resolved Raman Spectroelectrochemistry. *Electrochim. Commun.* **2015**, *54*, 14–17.
- (53) Nagatani, H.; Suzuki, S.; Fermín, D. J.; Girault, H. H.; Nakatani, K. Interfacial Behavior of Sulforhodamine 101 at the Polarized water/1,2-Dichloroethane Interface Studied by Spectroelectrochemical Techniques. *Anal. Bioanal. Chem.* **2006**, *386* (3), 633–638.
- (54) Ishizaka, S.; Kim, H. B.; Kitamura, N. Time-Resolved Total Internal Reflection Fluorometry Study on Polarity at a Liquid/liquid Interface. *Anal. Chem.* **2001**, *73* (11), 2421–2428.
- (55) Luo, G.; Malkova, S.; Pingali, S. V.; Schultz, D. G.; Lin, B.; Meron, M.; Benjamin, I.; Vanýsek, P.; Schlossman, M. L. Structure of the Interface between Two Polar Liquids: Nitrobenzene and Water. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110* (10), 4527–4530.
- (56) Luo, G.; Malkova, S.; Yoon, J.; Schultz, D. G.; Lin, B.; Meron, M.; Benjamin, I.; Vanýsek, P.; Schlossman, M. L. Ion Distributions at the Nitrobenzene-Water Interface Electrified by a Common Ion. *J. Electroanal. Chem.* **2006**, *593* (1-2), 142–158.
- (57) Strutwolf, J.; Barker, A. L.; Gonsalves, M.; Caruana, D. J.; Unwin, P. R.; Williams, D. E.; Webster, J. R. P. Probing Liquid|Liquid Interfaces Using Neutron Reflection Measurements and Scanning Electrochemical Microscopy. *J. Electroanal. Chem.* **2000**, *483* (1–2), 163–173.
- (58) Helmholtz, H. Ueber Einige Gesetze Der Vertheilung Elektrischer Ströme in Körperlichen Leitern Mit Anwendung Auf Die Thierisch-Elektrischen Versuche. *Ann. Phys.* **1853**, *165* (6), 211–233.
- (59) Gros, M.; Gromb, S.; Gavach, C. The Double Layer and Ion Adsorption at the Interface between Two Non-Miscible Solutions. Part II. Electrocapillary Behaviour of Some Water-Nitrobenzene Systems. *J. Electroanal. Chem.* **1978**, *89*, 29–36.
- (60) Samec, Z.; Mareček, V.; Homolka, D. The Double Layer at the Interface between Two Immiscible Electrolyte Solutions Part I. Capacity of the Water/nitrobenzene Interface. *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.* **1981**, *126*, 121–129.
- (61) Girault, H. H.; Schiffrin, D. J. Thermodynamic Surface Excess of Water and Ionic Solvation at the Interface between Immiscible Liquids. *J. Electroanal. Chem.* **1983**, *150*, 43–49.
- (62) Girault, H. H. Electrochemistry at the Interface Between Two Immiscible Electrolyte Solutions. *Electrochim. Acta* **1987**, *32* (3), 383–385.
- (63) Torrie, G. M.; Valteau, J. P. Double Layer Structure at the Interface between Two Immiscible Electrolyte Solutions. *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.* **1986**, *206*, 69–79.
- (64) Samec, Z. Electrical Double Layer at the Interface between Two Immiscible Electrolyte Solutions. *Chem. Rev.* **1988**, *88*, 617–632.
- (65) Bard, A. J.; Faulkner, L. R.; Swain, E.; Robey, C. *Fundamentals and Applications*, 2nd Edition; New York, 2001.
- (66) Reymond, F.; Fermín, D.; Lee, H. J.; Girault, H. H. Electrochemistry at Liquid/liquid Interfaces: Methodology and Potential Applications. *Electrochim. Acta* **2000**, *45* (15-16), 2647–2662.

- (67) Girault, H. H. Charge Transfer across Liquid-Liquid Interfaces. *Mod. Asp. Electrochem. n<sup>o</sup>. 25* **1993**, No. 25, 1–62.
- (68) Wandlowski, T.; Marecek, V.; Holub, K.; Samec, Z. Ion Transfer across Liquid-Liquid Phase Boundaries: Electrochemical Kinetics by Faradaic Impedance. *J. Phys. Chem.* **1989**, *93* (12), 8204–8212.
- (69) Shao, Y.; Osborne, M. D.; Girault, H. H. Assisted Ion Transfer at Micro-ITIES Supported at the Tip of Micropipettes. *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.* **1991**, *318* (1-2), 101–109.
- (70) Yamada, S. Advancement in Stereochemical Aspects of Schiff Base Metal Complexes. *Coord. Chem. Rev.* **1999**, *192*, 537–555.
- (71) Kumar, S.; Dhar, D. N.; Saxena, P. N. Applications of Metal Complexes of Schiff Bases- A Review. *J. Sci. Ind. Res.* **2009**, *68* (March), 181–187.
- (72) Brodowska, K.; Chemistry, F. Schiff Bases – Interesting Range of Applications in Various Fields of Science. *Chemik* **2014**, *68* (2), 129–134.
- (73) Gupta, K. C.; Sutar, A. K. Catalytic Activities of Schiff Base Transition Metal Complexes. *Coord. Chem. Rev.* **2008**, *252* (12-14), 1420–1450.
- (74) Nishinaga, A.; Yamada, T.; Fujisawa, H.; Ishizaki, K.; Ihara, H.; Matsuura, T. Catalysis of Cobalt-Schiff Base Complexes in Oxygenation of Alkenes: On the Mechanism of Ketone Formation. *J. Mol. Catal.* **1988**, *48*, 249–264.
- (75) Shi, Q.; Xu, L.; Ji, J.; Li, Y.; Wang, R.; Zhou, Z.; Cao, R.; Hong, M.; Chan, A. S. C. Syntheses and Structures of Two Anion-Templated Dinuclear Cadmium Complexes with Diamino-Binaphthyl Schiff Bases as Ligands. *Inorg. Chem. Commun.* **2004**, *7* (12), 1254–1257.
- (76) Mironov, E.; Tsarkova, M.; Pisarenko, E.; Gritskova, I.; Levitin, I. Emulsion Polymerization Initiated by Alkylcobalt-tridentate Schiff Base Complexes in Relation to Kinetics and Mechanism of Their Decomposition. *Polym. Bull.* **2007**, *58* (5-6), 837–848.
- (77) You, Z.-L.; Zhu, H.-L. Syntheses, Crystal Structures, and Antibacterial Activities of Four Schiff Base Complexes of Copper and Zinc. *Zeitschrift für Anorg. und Allg. Chemie* **2004**, *630* (15), 2754–2760.
- (78) Golcu, A.; Tumer, M.; Demirelli, H.; Wheatley, R. A. Cd(II) and Cu(II) Complexes of Polydentate Schiff Base Ligands: Synthesis, Characterization, Properties and Biological Activity. *Inorganica Chim. Acta* **2005**, *358* (6), 1785–1797.
- (79) Bagihalli, G. B.; Avaji, P. G.; Patil, S. a.; Badami, P. S. Synthesis, Spectral Characterization, in Vitro Antibacterial, Antifungal and Cytotoxic Activities of Co(II), Ni(II) and Cu(II) Complexes with 1,2,4-Triazole Schiff Bases. *Eur. J. Med. Chem.* **2008**, *43* (12), 2639–2649.
- (80) Jarrahpor, A. A.; Motamedifar, M.; Pakshir, K.; Hadi, N.; Zarei, M. Synthesis of Novel Azo Schiff Bases and Their Antibacterial and Antifungal Activities. *Molecules* **2004**, *9*, 815–824.
- (81) Chohan, Z. H.; Mahmood-Ul-Hassan; Khan, K. M.; Supuran, C. T. In-Vitro Antibacterial, Antifungal and Cytotoxic Properties of Sulfonamide-Derived Schiff's Bases and Their Metal Complexes. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2005**, *20* (2), 183–188.
- (82) Gungor, E.; Celen, S.; Azaz, D.; Kara, H. Two Tridentate Schiff Base Ligands and Their Mononuclear Cobalt (III) Complexes: Synthesis, Characterization, Antibacterial and Antifungal Activities. *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* **2012**, *94*, 216–221.

- (83) Wang, P.-H.; Keck, J. G.; Lien, E. J.; Lai, M. M. C. Design , Synthesis , Testing , and Quantitative Structure-Activity Relationship Analysis of Substituted Salicylaldehyde Schiff Bases of Tosylate as New Antiviral Agents against Coronavirus. *J. Med. Chem.* **1990**, *33* (2), 608–614.
- (84) Jarrahpour, A.; Khalili, D.; De Clercq, E.; Salmi, C.; Brunel, J. M. Synthesis, Antibacterial, Antifungal and Antiviral Activity Evaluation of Some New Bis-Schiff Bases of Isatin and Their Derivatives. *Molecules* **2007**, *12* (8), 1720–1730.
- (85) Kumar, K. S.; Ganguly, S.; Veerasamy, R.; De Clercq, E. Synthesis, Antiviral Activity and Cytotoxicity Evaluation of Schiff Bases of Some 2-Phenyl Quinazoline-4(3H)-Ones. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45* (11), 5474–5479.
- (86) Crowe, A. J.; Smith, P. J.; Atassi, G. Investigations into the Antitumour Activity of Organotin Compounds. I. Diorganotin Dihalide and Di-Pseudohalide Complexes. *Chem. Biol. Interact.* **1980**, *32*, 171–178.
- (87) Lumme, P.; Elo, H.; Jänne, J. Antitumor Activity and Metal Complexes of the First Transition Series . Trans-Bis ( Salicylaldoximato ) Copper ( II ) and Related Copper ( II ) Complexes , a Novel Group of Potential Antitumor Agents. *Inorganica Chim.* **1984**, *92*, 241–251.
- (88) Xiao, Y. A. N.; Bi, C.; Fan, Y.; Cui, C.; Zhang, X. I. A.; Dou, Q. P. L-Glutamine Schiff Base Copper Complex as a Proteasome Inhibitor and an Apoptosis Inducer in Human Cancer Cells. *Int. J. Oncol.* **2008**, *33*, 1073–1079.
- (89) Raman, N.; Jeyamurugan, R.; Raj Kapoor, B.; Magesh, V. Metal-Based Antitumor, Cytotoxic and Antimicrobial Activity: Pharmacological Evaluation of Knoevenagel Condensate B-Diketone Schiff Base Thiosemicarbazone Cu(II); and Zn(II) Complexes. *Appl. Organomet. Chem.* **2009**, *23* (7), 283–290.
- (90) Losada, J.; Peso, I.; Beyer, L. Electrochemical and Spectroelectrochemical Properties of Copper ( II ) Schiff-Base Complexes. *Inorganica Chim. Acta* **2001**, *321*, 107–115.
- (91) Wang, Q.; Bi, C. F.; Fan, Y. H.; Zhang, X.; Zuo, J.; Liu, S. B. A Novel copper(II) Complex with Schiff Base Derived from O-Vanillin and L-Methionine: Syntheses and Crystal Structures. *Russ. J. Coord. Chem.* **2011**, *37* (3), 228–234.
- (92) Franks, M.; Gadzhieva, A.; Ghandhi, L.; Murrell, D.; Blake, A. J.; Davies, E. S.; Lewis, W.; Moro, F.; McMaster, J.; Der, M. S. Five Coordinate M(II)-Diphenolate [M = Zn(II), Ni(II), and Cu(II)] Schiff Base Complexes Exhibiting Metal- and Ligand-Based Redox Chemistry. *Inorg. Chem.* **2013**, *52*, 660–670.
- (93) González-Baró, A. C.; Pis-Diez, R.; Parajón-Costa, B. S.; Rey, N. A. Spectroscopic and Theoretical Study of the *o*-Vanillin Hydrazone of the Mycobactericidal Drug Isoniazid. *J. Mol. Struct.* **2012**, *1007*, 95–101.
- (94) Tang, B.; Zhang, J.; Chen, Z. Synthesis and Characterization of a Novel Cross-Linking Complex of B-Cyclodextrin-*o*-Vanillin Benzoylhydrazone and Its Selective Spectrofluorimetric Determination of Trace Amounts of Zinc. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2003**, *59* (11), 2519–2526.
- (95) Zhao, G.; Feng, Y.; Wen, Y. Syntheses, Crystal Structures and Kinetic Mechanisms of Thermal Decomposition of Rare Earth Complexes with Schiff Base Derived from *o*-Vanillin and *p*-Toluidine. *J. Rare Earths* **2006**, *24* (3), 268–275.
- (96) Najihah, S.; Bakar, A.; Bahron, H.; Kassim, K. Synthesis and Characterization of a Novel Schiff Base Derived from 2 , 4 , 6-Trimethyl- M - Phenylenediamine with *o*-Vanillin and Its Metal Complexes. *CSSR 2010 - 2010 Int. Conf. Sci. Soc. Res.* **2010**, 463–466.



- (97) Tiemann, F. Ueber Die Der Coniferyl- Und Vanillinreihe Angehörigen Verbindungen. *Berichte der Dtsch. Chem. Gesellschaft* **1876**, *9* (1), 409–423.
- (98) Tiemann, F.; Haarmann, W. Ueber Eine Methode Zur Quantitativen Bestimmung Des Vanillins in Der Vanille. *Zeitschrift für Anal. Chemie* **1876**, *15* (1), 350–352.
- (99) Kim, J. H.; Chan, K. L.; Mahoney, N.; Campbell, B. C. Antifungal Activity of Redox-Active Benzaldehydes That Target Cellular Antioxidation. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* **2011**, 10–23.
- (100) Santosh Kumar, S.; Priyadarsini, K. I.; Sainis, K. B. Free Radical Scavenging Activity of Vanillin and *o*-Vanillin Using 1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl (DPPH) Radical. *Redox Repor* **2002**, *7* (1), 35–40.
- (101) Lirdprapamongkol, K.; Sakurai, H.; Kawasaki, N.; Choo, M.-K.; Saitoh, Y.; Aozuka, Y.; Singhirunnusorn, P.; Ruchirawat, S.; Svasti, J.; Saiki, I. Vanillin Suppresses in Vitro Invasion and in Vivo Metastasis of Mouse Breast Cancer Cells. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2005**, *25* (1), 57–65.
- (102) Ita, B. I. A Study of Corrosion Inhibition of Mild Steel in 0.1 M Hydrochloric Acid by *o*-Vanillin and *o*-Vanillin Hydrazone. *Bull. Electrochem.* **2004**, *20* (8), 363–370.
- (103) Eddy, N. O.; Ita, B. I.; Ebenso, E. E. Experimental and Theoretical Studies on the Corrosion Inhibition Potentials of Some Anisole Derivatives for Mild Steel. *Int. J. Electrochem. Sci.* **2011**, *6* (6), 2101–2121.
- (104) Liu, Z.; Wang, G.; Liu, B.; Chen, S. Method for Preparing Metal Corrosion Inhibitor Substituted Pyridinecarbonyl Hydrazone, 2010.
- (105) Shi, L.; Fang, A. R.; Xue, A. J.; Xiao, A. Z.; Tan, A. S. Synthesis , Characterization , and Antibacterial and Cytotoxic Study of Metal Complexes with Schiff Base Ligands. *Aust. J. Chem.* **2008**, *61*, 288–296.
- (106) Dharmaraj, N.; Viswanatharmurthi, P.; Natarajan, K. Ruthenium ( II ) Complexes Containing Bidentate Schiff Bases and Their Antifungal Activity. *Transit. Met. Chem.* **2001**, *26*, 105–109.
- (107) Jouad, E. M.; Riou, A.; Allain, M.; Khan, M. A.; Bouet, G. M. Synthesis, Structural and Spectral Studies of 5-Methyl 2-Furaldehyde Thiosemicarbazone and Its Co, Ni, Cu and Cd Complexes. *Polyhedron* **2001**, *20* (1-2), 67–74.
- (108) Chandra, S.; Gupta, K. Chromium (III), Manganese (II), Iron (III), Cobalt (II), Nickel (II) and Copper (II) Complexes with a Pentadentate , 15-Membered New Macrocyclic Ligand. *Transit. Met. Chem.* **2002**, *27* (2), 196–199.
- (109) Mammino, L. Investigation of the Antioxidant Properties of Hyperjovinol A through Its Cu(II) Coordination Ability. *J. Mol. Model.* **2012**, *19* (5), 2127–2142.
- (110) Kabanda, M. M. Antioxidant Activity of Rooperol Investigated Though Cu (I and II) Chelation Ability and the Hydrogen Transfer Mechanism: A DFT Study. *Chem. Res. Toxicol.* **2012**, *25*, 253–2166.
- (111) Vrontaki, E.; Leonis, G.; Papadopoulos, M. G.; Simcic, M.; Golic Grdadolnik, S.; Afantitis, A.; Melagraki, G.; Hadjikakou, S. K.; Mavromoustakos, T. Comparative Binding Effects of Aspirin and Anti-Inflammatory Cu Complex in the Active Site of LOX-1. *J. Chem. Inf. Model.* **2012**, *52* (12), 3293–3301.
- (112) Joseph, J.; Nagashri, K. Novel Copper-Based Therapeutic Agent for Anti-Inflammatory: Synthesis, Characterization, and Biochemical Activities of copper(II) Complexes of Hydroxyflavone Schiff Bases. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2012**, *167* (5), 1446–1458.

- (113) Temerk, Y. M.; Ibrahim, M. S.; Kotb, M.; Schuhmann, W. Interaction of Antitumor Flavonoids with dsDNA in the Absence and Presence of Cu(II). *Anal. Bioanal. Chem.* **2013**, *405* (11), 3839–3846.
- (114) Silavi, R.; Divsalar, A.; Saboury, A. A. A Short Review on the Structure–function Relationship of Artificial Catecholase/tyrosinase and Nuclease Activities of Cu-Complexes. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2012**, *30* (6), 752–772.
- (115) Reinsch, H. Einige Bemerkungen Über Catechu. *Repert. für die Pharm.* **1839**, *68*, 49–58.
- (116) 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* (2), 81–91.
- (117) Van der Meer, J. R.; de Vos, W. M.; Harayama, S.; Zehnder, A. J. Molecular Mechanisms of Genetic Adaptation to Xenobiotic Compounds. *Microbiol. Rev.* **1992**, *56* (4), 677–694.
- (118) 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* (3-4), 417–424.
- (119) Zein, A. El; Coeur, C.; Obeid, E.; Lauraguais, A.; Fagniez, T. Reaction Kinetics of Catechol (1,2-Benzenediol) and Guaiacol (2-Methoxyphenol) with Ozone. *J. Phys. Chem. A* **2015**, No. 119, 6759–6765.
- (120) Bukowska, B.; Kowalska, S. Phenol and Catechol Induce Prehemolytic and Hemolytic Changes in Human Erythrocytes. *Toxicol. Lett.* **2004**, *152* (1), 73–84.
- (121) Kalyanaraman, B.; Nemeč, J.; Sinha, B. K. Characterization of Free Radicals Produced during Oxidation of Etoposide (VP-16) and Its Catechol and Quinone Derivatives. An ESR Study. *Biochemistry* **1989**, *28* (11), 4839–4846.
- (122) Valko, M.; Rhodes, C. J.; Moncol, J.; Izakovic, M.; Mazur, M. Free Radicals, Metals and Antioxidants in Oxidative Stress-Induced Cancer. *Chem. Biol. Interact.* **2006**, *160* (1), 1–40.
- (123) Boots, A. W.; Haenen, G. R. M. M.; Den Hartog, G. J. M.; Bast, A. Oxidative Damage Shifts from Lipid Peroxidation to Thiol Arylation by Catechol-Containing Antioxidants. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **2002**, *1583* (3), 279–284.
- (124) Nematollahi, D.; Tammari, E.; Sharifi, S.; Kazemi, M. Mechanistic Study of the Oxidation of Catechol in the Presence of Secondary Amines by Digital Simulation of Cyclic Voltammograms. *Electrochim. Acta* **2004**, *49* (4), 591–595.
- (125) Goldstein, D. S.; Sullivan, P.; Holmes, C.; Miller, G. W.; Alter, S.; Strong, R.; Mash, D. C.; Kopin, I. J.; Sharabi, Y. Determinants of Buildup of the Toxic Dopamine Metabolite DOPAL in Parkinson’s Disease. *J. Neurochem.* **2013**, *126* (5), 591–603.
- (126) Ham, A.; Kim, D. W.; Kim, K. H.; Lee, S. J.; Oh, K. B.; Shin, J.; Mar, W. Reynosin Protects against Neuronal Toxicity in Dopamine-Induced SH-SY5Y Cells and 6-Hydroxydopamine-Lesioned Rats as Models of Parkinson’s Disease: Reciprocal up-Regulation of E6-AP and down-Regulation of  $\alpha$ -Synuclein. *Brain Res.* **2013**, *1524*, 54–61.
- (127) Christopher, L.; Marras, C.; Duff-Canning, S.; Koshimori, Y.; Chen, R.; Boileau, I.; Segura, B.; Monchi, O.; Lang, A. E.; Rusjan, P.; Houle, S.; Strafella, A. P. Combined Insular and Striatal Dopamine Dysfunction Are Associated with Executive Deficits in Parkinson’s Disease with Mild Cognitive Impairment. *Brain* **2014**, *137* (2), 565–575.
- (128) Kiani, A.; Raouf, J. B.; Nematollahi, D.; Ojani, R. Electrochemical Study of Catechol in the Presence of Dibuthylamine and Diethylamine in Aqueous Media: Part 1. Electrochemical Investigation. *Electroanalysis* **2005**, *17* (19), 1755–1760.

- (129) Ghanem, M. A. Electrocatalytic Activity and Simultaneous Determination of Catechol and Hydroquinone at Mesoporous Platinum Electrode. *Electrochem. commun.* **2007**, *9* (10), 2501–2506.
- (130) Nezhad, M. R. H.; Alimohammadi, M.; Tashkhourian, J.; Razavian, S. M. Optical Detection of Phenolic Compounds Based on the Surface Plasmon Resonance Band of Au Nanoparticles. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2008**, *71* (1), 199–203.
- (131) Schad, H.; Schäfer, F.; Weber, L.; Seidel, H. J. Determination of Benzene Metabolites in Urine of Mice by Solid-Phase Extraction and High-Performance Liquid Chromatography. *J. Chromatogr.* **1992**, *593* (1-2), 147–151.
- (132) Qi, H.; Zhang, C. Simultaneous Determination of Hydroquinone and Catechol at a Glassy Carbon Electrode Modified with Multiwall Carbon Nanotubes. *Electroanalysis* **2005**, *17* (10), 832–838.
- (133) Zhao, D.-M.; Zhang, X.-H.; Feng, L.-J.; Jia, L.; Wang, S.-F. Simultaneous Determination of Hydroquinone and Catechol at PASA/MWNTs Composite Film Modified Glassy Carbon Electrode. *Colloids Surf. B. Biointerfaces* **2009**, *74* (1), 317–321.
- (134) Asan, A.; Isildak, I. Short Communication Determination of Major Phenolic Compounds in Water by Reversed-Phase Liquid Chromatography after Pre-Column Derivatization with Benzoyl Chloride. *J. Chromatogr. A* **2003**, *988*, 145–149.
- (135) Hasani, M.; Mohammadi, M.; Shariati-Rad, M.; Abdollahi, H. H-Point Curve Isolation Method for Determination of Catechol in Complex Unknown Mixtures. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2012**, *96*, 563–568.
- (136) Zanfrogini, B.; Colina, Á.; 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* (12), 2112–2119.
- (137) Song, Y. Z.; Zhou, J. F.; Zhu, F. X.; Ye, Y.; Xie, J. M. Study on the Oxidation Form of Adenine in Phosphate Buffer Solution. *Comput. Biol. Med.* **2010**, *40* (7), 671–679.
- (138) Neudeck, A.; Petr, A.; Dunsch, L. Redox Mechanism of Polyaniline Studied by Simultaneous ESR-UV-Vis Spectroelectrochemistry. *Synth. Met.* **1999**, *107* (3), 143–158.
- (139) Ibañez, D.; Santidrian, A.; Heras, A.; Kalbáč, M.; Colina, Á. Study of Adenine and Guanine Oxidation Mechanism by Surface-Enhanced Raman Spectroelectrochemistry. *J. Phys. Chem. C* **2015**, *119*, 8191–8198.
- (140) Liu, X.; Zhang, Z.; Cheng, G.; Dong, S. Spectroelectrochemical and Voltammetric Studies of L-DOPA. *Electroanalysis* **2003**, *15* (2), 103–107.
- (141) Kaim, W.; Reinhardt, R.; Greulich, S.; Fiedler, J. Resolving the Two-Electron Process for the Couple  $[(C_5Me_5)M(N^N)Cl]^+ / [(C_5Me_5)M(N^N)]$  (M = Rh, Ir) into Two One-Electron Steps Using the 2,2'-Azobis(Pyridine) N^N Ligand, Fast Scan Cyclic Voltammetry, and Spectroelectro. *Organometallics* **2003**, *22* (6), 2240–2244.
- (142) Kuwana, T.; Darlington, R. K.; Leedy, D. W. Electrochemical Studies Using Conducting Glass Indicator Electrodes. *Anal. Chem.* **1964**, *36* (10), 2023–2025.
- (143) Cui, H.; Wu, L.; Chen, J.; Lin, X. Multi-Mode in Situ Spectroelectrochemical Studies of Redox Pathways of Adrenaline. *J. Electroanal. Chem.* **2001**, *504* (2), 195–200.
- (144) López-Palacios, J.; Heras, A.; Colina, Á.; Ruiz, V. Bidimensional Spectroelectrochemical Study on Electrogeneration of Soluble Prussian Blue from hexacyanoferrate(II) Solutions. *Electrochim. Acta* **2004**, *49* (7), 1027–1033.

- (145) D'Antonio, J.; D'Antonio, E. L.; Thompson, M. K.; Bowden, E. F.; Franzen, S.; Smirnova, T.; Ghiladi, R. A. Spectroscopic and Mechanistic Investigations of Dehaloperoxidase B from Amphitrite Ornata. *Biochemistry* **2010**, *49* (31), 6600–6616.
- (146) Zanardi, C.; Terzi, F.; Pigani, L.; Heras, A.; Colina, Á.; López-Palacios, J.; Seeber, R. Development and Characterisation of a Novel Composite Electrode Material Consisting of poly(3,4-Ethylenedioxythiophene) Including Au Nanoparticles. *Electrochim. Acta* **2008**, *53* (11), 3916–3923.
- (147) McCreery, R. L. *Physical Methods of Chemistry (volumen 2)*; Sons, J. W. &, Ed.; New York, 1984.
- (148) Niu, J.; Dong, S. Transmission Spectroelectrochemistry. *Rev. Anal. Chem.* **1996**, *15* (1-2), 1–171.
- (149) Robinson, J. *Electrochemistry. A Specialist Periodical Report (volumen 9)*; Pletcher, D., Ed.; The Royal Society of Chemistry: London, 1984.
- (150) Kuwana, T.; Winograd, N. *Electroanalytical Chemistry (volumen 7)*; Dekker, M., Ed.; New York, 1974.
- (151) Heineman, W. R.; Hawkridge, F. M. *Electroanalytical Chemistry (volumen 13)*; Bard, A. J., Dekker, M., Eds.; New York, 1984.
- (152) Gale, R. . *Spectroelectrochemistry. Theory and Practice*; Press, P., Ed.; New York, 1988.
- (153) Kaim, W.; Fiedler, J. Spectroelectrochemistry: The Best of Two Worlds. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38* (12), 3373–3382.
- (154) Greef, R.; Peat, R.; Peter, I.; Pletcher, D.; Robinson, J. *Instrumental Methods in Electrochemistry*; Limited, E. H., Ed.; England, 1990.
- (155) Kissinger, P. T.; Heineman, W. R. *Laboratory Techniques In Electroanalytical Chemistry*, 2<sup>nd</sup> ed.,; New York, 1996.
- (156) Cravino, A.; Neugebauer, H.; Luzzati, S.; Catellani, M.; Petr, A.; Dunsch, L.; Sariciftci, N. S. Positive and Negative Charge Carriers in Doped or Photoexcited Polydithienothiophenes : A Comparative Study Using Raman, Infrared, and Electron Spin Resonance Spectroscopy. *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 3583–3591.
- (157) Krejeik, M.; Dangk, M. Simple Construction of an Infrared Optically Transparent Thin-Layer Electrochemical Cell Applications to the Redox Reactions of Ferrocene , Mn<sub>2</sub>(CO)<sub>10</sub> and Mn(CO)<sub>3</sub>(3,5-di-t-butyl-catecholate)-. *J. Electroanal. Chem.* **1991**, *317*, 179–187.
- (158) Iwasita, T.; Nart, F. C. In Situ Infrared Spectroscopy at Electrochemical Interfaces. *Prog. Surf. Sci.* **1997**, *55* (4), 271–340.
- (159) Lee, S.-B.; Pyun, S.-I. Critical Assessment of a New in Situ Spectroelectrochemical Cell Designed for the Study of Interfacial Reactions between a Porous Graphite Anode and Alkyl Carbonate Solution. *J. Solid State Electrochem.* **2003**, *7* (4), 201–207.
- (160) Mizuoka, K.; Ikeda, Y. IR Spectroelectrochemical Study on UVO<sub>2</sub><sup>+</sup> Complex: First Evidence for Weakening of U=O Bond Strength in Uranyl Moiety with Reduction from U(VI) to U(V). *Inorg. Chem.* **2003**, *42* (11), 3396–3398.
- (161) Durnie, W. H.; De Marco, R.; Jefferson, A.; Kinsella, B. J. In Situ SERS Study of the Adsorption of Inhibitors of Carbon Dioxide Corrosion. *Surf. Interface Anal.* **2003**, *35* (6), 536–543.
- (162) Wandlowski, T.; Ataka, K.; Pronkin, S.; Diesing, D. Surface Enhanced Infrared Spectroscopy—Au(1 1 1-20nm)/sulphuric Acid—New Aspects and Challenges. *Electrochim. Acta* **2004**, *49* (8), 1233–1247.

- (163) Bistolos, N.; Christenson, A.; Ruzgas, T.; Jung, C.; Scheller, F. W.; Wollenberger, U. Spectroelectrochemistry of Cytochrome P450cam. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2004**, *314* (3), 810–816.
- (164) Ren, B.; Lian, X.-B.; Jian-Feng Li; Fang, P.-P.; Lai, Q.-P.; Tian, Z.-Q. Spectroelectrochemical Flow Cell with Temperature Control for Investigation of Electrocatalytic Systems with Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *Faraday Discuss.* **2008**, *140*, 155–165.
- (165) Roberts, L. M.; Lindahl, P. a. Stoichiometric Reductive Titrations of Desulfovibrio Gigas Hydrogenase. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117* (9), 2565–2572.
- (166) Kondo, T.; Tamura, K.; Takahasi, M.; Mizuki, J.; Uosaki, K. A Novel Spectroelectrochemical Cell for in Situ Surface X-Ray Scattering Measurements of Single Crystal Disk Electrodes. *Electrochim. Acta* **2002**, *47* (19), 3075–3080.
- (167) Shepherd, J.; Yang, Y.; Bizzotto, D. Visualization of Potential Induced Formation of Water-Insoluble Surfactant Aggregates by Epi-fluorescence Microscopy. *J. Electroanal. Chem.* **2002**, *524-525*, 54–61.
- (168) Kaval, N.; Seliskar, C. J.; Heineman, W. R. Spectroelectrochemical Sensing Based on Multimode Selectivity Simultaneously Achievable in a Single Device. 16. Sensing by Fluorescence. *Anal. Chem.* **2003**, *75* (22), 6334–6340.
- (169) Tan, L.; Zie, Q.; Yao, S. Electrochemical and Spectroelectrochemical Studies on Pyridoxine Hydrochloride Using a Poly(methylene Blue) Modified Electrode. *Electroanalysis* **2004**, *16* (19), 1592–1597.
- (170) Liu, W.; Lu, Y.; Liu, Y.; Liu, K.; Yan, Y.; Kong, J.; Xu, C.; Qian, S. Effect of the in Situ Electrochemical Oxidation on the Pigment-protein Arrangement and Energy Transfer in Light-Harvesting Complex from Rhodospira rubra. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2006**, *340* (2), 505–511.
- (171) Lei, C.; Hu, D.; Ackerman, E. J. Single-Molecule Fluorescence Spectroelectrochemistry of Cresyl Violet. *Chem. Commun.* **2008**, No. 43, 5490–5492.
- (172) Casanova-Moreno, J. R.; Bizzotto, D. Frequency Response Analysis of Potential-Modulated Orientation Changes of a DNA Self Assembled Layer Using Spatially Resolved Fluorescence Measurements. *Electrochim. Acta* **2014**, *162*, 62–71.
- (173) Porter, M. D.; Kuwana, T. Glassy Carbon and Graphite Electrodes with a Hole For Long Path Length Thin-Layer Spectroelectrochemistry. *Anal. Chem.* **1984**, *56* (3), 529–534.
- (174) Sakai, N.; Ebina, Y.; Takada, K.; Sasaki, T. Electronic Band Structure of Titania Semiconductor Nanosheets Revealed by Electrochemical and Photoelectrochemical Studies. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (18), 5851–5858.
- (175) Heras, A.; Colina, A.; López-Palacios, J.; Ayala, P.; Sainio, J.; Ruiz, V.; Kauppinen, E. I.; Colina, A.; López-Palacios, J.; Ayala, P.; Sainio, J.; Ruiz, V.; Kauppinen, E. I. Electrochemical Purification of Carbon Nanotube Electrodes. *Electrochem. commun.* **2009**, *11* (7), 1535–1538.
- (176) Kaufman, F. B.; Schroeder, A. H.; Engler, E. M.; Kramer, S. R.; Chambers, J. Q. Ion and Electron Transport in Stable, Electroactive Tetrathiafulvalene Polymer Coated Electrodes. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102* (2), 483–488.
- (177) Haines, R. J.; Wittrig, R. E.; Kubiak, C. P. Electrocatalytic Reduction of Carbon Dioxide by the Binuclear Copper Complex. *Inorg. Chem.* **1994**, *2*, 4723–4728.

- (178) Gaillard, F.; Levillain, E. Visible Time-Resolved Spectroelectrochemistry : Application to Study of the Reduction of Sulfur ( S 8 ) in Dimethylformamide. *J. Electroanal. Chem.* **1995**, *398*, 77–87.
- (179) Anderson, J. L.; Kuwana, T.; Hartzell, C. R. Spectroelectrochemical Investigations of Stoichiometry and Oxidation-Reduction Potentials of Cytochrome c Oxidase Components in the Presence of Carbon Monoxide: The “Invisible” Copper. *Biochemistry* **1976**, *15* (17), 3847–3855.
- (180) Kenyhercz, T. M.; DeAngelis, T. P.; Norris, B. J.; Heineman, W. R.; Mark Jr, H. B. Thin Layer Spectroelectrochemical Study of Vitamin B12 and Related Cobalamin Compounds in Aqueous Media. *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, *9*, 2469–2477.
- (181) Arciero, D. M.; Collins, M. J.; Haladjian, J.; Bianco, P.; Hooper, A. B. Resolution of the Four Hemes of Cytochrome c554 from *Nitrosomonas Europaea* by Redox Potentiometry and Optical Spectroscopy. *Biochemistry* **1991**, *30*, 11459–11465.
- (182) Gao, G.; Wurm, D. B.; Kim, Y.-T.; Kispert, L. D. Electrochemical Quartz Crystal Microbalance, Voltammetry, Spectroelectrochemical, and Microscopic Studies of Adsorption Behavior for (7E,7'Z)-diphenyl-7,7'-diapocarotene Electrochemical Oxidation Product. *J. Phys. Chem. B* **1997**, *101* (11), 2038–2045.
- (183) Carlier, V.; Skompska, M.; Buess-Herman, C. Electrochemical Quartz Crystal Microbalance and Spectroelectrochemical Studies of the Influence of Cations on the Formation and Electroactivity of poly(N-vinylcarbazole) Films in Acetonitrile Solutions. *J. Electroanal. Chem.* **1998**, *456* (1-2), 139–152.
- (184) Ruiz, V.; Colina, Á.; Heras, A.; López-Palacios, J.; Heras, M. A.; López-Palacios, J. Quantized Spectroelectrochemical Behaviour of Monolayer-Protected Gold Cluster Films Assessed by Reflectance Spectroelectrochemical Quartz Crystal Microbalance. *Electrochem. commun.* **2007**, *9* (2), 255–261.
- (185) Ruiz, V.; Colina, Á.; Heras, M. A.; López-Palacios, J. Potential Regulation of the Spectroelectrochemical Response of Monolayer-Protected Gold Cluster Films by Electrolyte Composition. *J. Phys. Chem. C* **2007**, *111* (11), 4277–4284.
- (186) Doherty III, W. J.; Wysocki Jr., R. J.; Armstrong, N. R.; Saavedra, S. S. Potential-Modulated , Attenuated Total Reflectance Spectroscopy of Copolymer Films on Indium-Tin Oxide. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 4900–4907.
- (187) Abd-Elwahed, A.; Holze, R. In Situ Near-Infrared Spectroelectrochemical Investigation of Redox States of Polyaniline during Growth and Doping. *Russ. J. Electrochem.* **2003**, *39* (4), 431–437.
- (188) Usov, P. M.; Fabian, C.; D’Alessandro, D. M. Rapid Determination of the Optical and Redox Properties of a Metal-Organic Framework via in Situ Solid State Spectroelectrochemistry. *Chem. Commun.* **2012**, *48* (33), 3945–3947.
- (189) Ashur, I.; Schulz, O.; McIntosh, C. L.; Pinkas, I.; Ros, R.; Jones, A. K. Transparent Gold as a Platform for Adsorbed Protein Spectroelectrochemistry: Investigation of Cytochrome c and Azurin. *Langmuir* **2012**, *28* (13), 5861–5871.
- (190) Pigani, L.; Heras, A.; Colina, Á.; Seeber, R.; López-Palacios, J. Electropolymerisation of 3,4-Ethylenedioxythiophene in Aqueous Solutions. *Electrochem. commun.* **2004**, *6* (11), 1192–1198.
- (191) Büschel, M.; Stadler, C.; Lambert, C.; Beck, M.; Daub, J. Heterocyclic Quinones as Core Units for Redox Switches : UV-Vis/NIR, FTIR Spectroelectrochemistry and DFT Calculations on the Vibrational and Electronic Structure of the Radical Anions. *J. Electroanal. Chem.* **2000**, *484*, 24–32.

- (192) Yun, K.-S.; Joo, S.; Kim, H.-J.; Kwak, J.; Yoon, E. Silicon Micromachined Infrared Thin-Layer Cell for In Situ Spectroelectrochemical Analysis of Aqueous and Nonaqueous Solvent System. *Electroanalysis* **2005**, *17* (11), 959–964.
- (193) Tam, T. K.; Chen, B.; Lei, C.; Liu, J. In Situ Regeneration of NADH via Lipoamide Dehydrogenase-Catalyzed Electron Transfer Reaction Evidenced by Spectroelectrochemistry. *Bioelectrochemistry* **2012**, *86*, 92–96.
- (194) Dong, Y.; Chi, Y.; Zheng, L.; Zhang, L.; Chen, L.; Chen, G. Spectroelectrochemistry for Studying Electrochemiluminescence Mechanism. *Electrochem. commun.* **2009**, *11* (5), 983–986.
- (195) Schroll, C. A.; Chatterjee, S.; Levitskaia, T. G.; Heineman, W. R.; Bryan, S. A. Electrochemistry and Spectroelectrochemistry of europium(III) Chloride in 3LiCl-2KCl from 643 to 1123 K. *Anal. Chem.* **2013**, *85* (20), 9924–9931.
- (196) Dreher, A.; Meyer, S.; Na, C.; Westphal, A.; Broda, H.; Sarkar, B.; Kaim, W.; Kurz, P.; Tuczek, F. Reduction and Protonation of Mo(IV) Imido Complexes with Depe Coligands: Generation and Reactivity of a  $S = 1/2$  Mo (III) Alkylnitrene. *Inorg. Chem.* **2013**, No. 52, 2335–2352.
- (197) Zhao, M.; Scherson, D. A. UV-Visible Reflection Absorption Spectroscopy in the Presence of Convective Flow. *Anal. Chem.* **1992**, *64*, 3064–3067.
- (198) Xie, Q.; Wei, W.; Nie, L.; Yao, S. Theory and Application of Potential-Step Transmission Chronoabsorptometry of Long-Pathlength Spectroelectrochemical Cells: Single Reversible Electrode Reaction. *Anal. Chem.* **1993**, *65*, 1888–1892.
- (199) Wanzhi, W.; Wei, W.; Xie, Q.; Yao, S. Theory and Application Spectroelectrochemistry Spectroelectrochemical of Analytical with Long Path Length Cells Part I. Integral Equation Connecting the Absorbance with the Concentration Distribution and Its Use in Digital Simulation for Long Path Length. *J. Electroanal. Chem.* **1992**, *328*, 9–20.
- (200) López-Palacios, J.; Colina, Á.; Heras, A.; Ruiz, V.; Fuente, L. Bidimensional Spectroelectrochemistry. *Anal. Chem.* **2001**, *73* (13), 2883–2889.
- (201) Cekić-Lasković, I.; Marković, R.; Minić, D. M.; Volanschi, E. Reactivity of Substituted 4-oxothiazolidine Derivatives in Electron Transfer Reactions: A Spectroelectrochemical Study and Mechanistic Aspects. *Electrochim. Acta* **2011**, *56* (14), 5257–5265.
- (202) Takashima, T.; Yamaguchi, A.; Hashimoto, K.; Irie, H.; Nakamura, R. In Situ UV-Vis Absorption Spectra of Intermediate Species for Oxygen-Evolution Reaction on the Surface of MO<sub>2</sub> in Neutral and Alkaline Media. *Electrochemistry* **2014**, *82* (5), 325–327.
- (203) Yang, Y. Y.; Ren, J.; Zhang, H. X.; Zhou, Z. Y.; Sun, S. G.; Cai, W. Bin. Infrared Spectroelectrochemical Study of Dissociation and Oxidation of Methanol at a Palladium Electrode in Alkaline Solution. *Langmuir* **2013**, *29* (5), 1709–1716.
- (204) Qiu, S.; Sun, L.; Chu, H.; Zou, Y.; Xu, F.; Matsuda, N. Study of Adsorption Behaviors of Meso-Tetrakis (4-N-Methylpyridyl) Porphine P-Toluenesulfonate at Indium–tin-Oxide Electrode/solution Interface by in-Situ Internal Reflection Spectroscopy and Cyclic Voltammetry. *Thin Solid Films* **2009**, *517* (9), 2905–2911.
- (205) Wilson, R. a.; Seliskar, C. J.; Talaska, G.; Heineman, W. R. Spectroelectrochemical Sensing of Pyrene Metabolites 1-hydroxypyrene and 1-hydroxypyrene-glucuronide. *Anal. Chem.* **2011**, *83* (10), 3725–3729.
- (206) Abu, E. A.; Bryan, S. A.; Seliskar, C. J.; Heineman, W. R. Assessing a Spectroelectrochemical Sensor's Performance for Detecting [Ru(bpy)<sub>3</sub>]<sup>2+</sup> in Natural and Treated Water. *Electroanalysis* **2012**, *24* (7), 1517–1523.

- (207) Boehme, S. C.; Wang, H.; Siebbeles, L. D. a; Vanmaekelbergh, D.; Houtepen, A. J. Electrochemical Charging of CdSe Quantum Dot Films: Dependence on Void Size and Counterion Proximity. *ACS Nano* **2013**, *7* (3), 2500–2508.
- (208) Links, D. A. Analytical Methods Development of a New Method Based on Scanner Electrochemistry: Applied for the Speciation of Iron (II) and Iron (III). *Anal. Methods* **2011**, *3*, 2268–2272.
- (209) Bonifacio, A.; Millo, D.; Gooijer, C.; Bosgschoten, R.; van der Zwan, G.; Boegschoten, R.; van der Zwan, G. Linearly Moving Low-Volume Spectroelectrochemical Cell for Microliter-Scale Surface-Enhanced Resonance Raman Spectroscopy of Heme Proteins. *Anal. Chem.* **2004**, *76* (5), 1529–1531.
- (210) Bonifacio, A.; Millo, D.; Keizers, P. H. J.; Boegschoten, R.; Commandeur, J. N. M.; Vermeulen, N. P. E.; Gooijer, C.; van der Zwan, G. Active-Site Structure, Binding and Redox Activity of the Heme-Thiolate Enzyme CYP2D6 Immobilized on Coated Ag Electrodes: A Surface-Enhanced Resonance Raman Scattering Study. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2008**, *13* (1), 85–96.
- (211) Babaei, A.; Brooksby, P. A.; Flood, A.; McQuillan A. J. ATR Infrared Spectroelectrochemistry of the Reduction Products of Anthraquinone Sulfonates in Aqueous Solutions. *Appl. Spectrosc.* **2000**, *54* (4), 496–501.
- (212) Kvarnström, C.; Neugebauer, H.; Ivaska, A.; Sariciftci, N. S. Vibrational Signatures of Electrochemical p- and p-Doping of Poly (3,4-Ethylenedioxythiophene) Films : An in Situ Attenuated Total Reflection Fourier Transform Infrared (ATR-FTIR) Study. *J. Mol. Struct.* **2000**, *521*, 271–277.
- (213) Brooksby, P. A.; Fawcett, W. R. Determination of the Electric Field Intensities in a Mid-Infrared Spectroelectrochemical Cell Using Attenuated Total Reflection Spectroscopy with the Otto Optical Configuration. *Anal. Chem.* **2001**, *73* (6), 1155–1160.
- (214) Kvarnström, C.; Neugebauer, H.; Kuzmany, H.; Sitter, H.; Sariciftci, N. S. An in Situ Spectrochemical Study of the Reduction of Thin Fullerene Films. *J. Electroanal. Chem.* **2001**, *511*, 13–19.
- (215) Neugebauer, H.; Kvarnström, C.; Cravino, A.; Yohannes, T.; Sariciftci, N. S. Photoexcited Spectroscopy and in Situ Electrochemical Spectroscopy in Conjugated Polymers : A Comparative Study. *Synth. Met.* **2001**, *116*, 115–121.
- (216) Visser, H.; Curtright, A. E.; McCusker, J. K.; Sauer, K. Attenuated Total Reflection Design for in Situ FT-IR Spectroelectrochemical Studies. *Anal. Chem.* **2001**, *73* (17), 4374–4378.
- (217) 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* (14), 3330–3335.
- (218) Bradshaw, J. T.; Mendes, S. B.; Armstrong, N. R.; Saavedra, S. S.; Chem, N. R. A. Broadband Coupling into a Single-Mode , Electroactive Integrated Optical Waveguide for Spectroelectrochemical Analysis of Surface-Confined Redox Couples with a Recently Reported Simplified Approach to Broadband. *Anal. Chem.* **2003**, *75* (5), 1080–1088.
- (219) Heineman, W. R.; Seliskar, C. J.; Richardson, J. N. Development and Application of Novel Thin-Film Spectroelectrochemical Sensors Possessing Three Modes of Selectivity. *Russ. J. Electrochem.* **2003**, *39* (8), 884–893.



- (220) Lee, S. B.; Pyun, S.-I. Critical Assessment of a New in Situ Spectroelectrochemical Cell Designed for the Study of Interfacial Reactions between a Porous Graphite Anode and Alkyl Carbonate Solution. *J. Solid State Electrochem.* **2003**, *7* (4), 201–207.
- (221) Richardson, J. N.; Aguilar, Z.; Kaval, N.; Andria, S. E.; Shtoyko, T.; Seliskar, C. J.; Heineman, W. R. Optical and Electrochemical Evaluation of Colloidal Au Nanoparticle-ITO Hybrid Optically Transparent Electrodes and Their Application to Attenuated Total Reflectance Spectroelectrochemistry. *Electrochim. Acta* **2003**, *48* (28), 4291–4299.
- (222) Neugebauer, H. Infrared Signatures of Positive and Negative Charge Carriers in Conjugated Polymers with Low Band Gaps. *J. Electroanal. Chem.* **2004**, *563* (1), 153–159.
- (223) Ge, C.; Doherty, W. J.; Mendes, S. B.; Armstrong, N. R.; Saavedra, S. S. Voltammetric and Waveguide Spectroelectrochemical Characterization of Ultrathin Poly(aniline)/poly(acrylic Acid) Films Self-Assembled on Indium-Tin Oxide. *Talanta* **2005**, *65* (5), 1126–1131.
- (224) Shih, W.-Y.; Yang, J. A New Infrared Spectroelectrochemical Cell for the Detection of Species Generated by Platinum and Screen-Printed Carbon Electrodes. *Electroanalysis* **2006**, *18* (3), 267–274.
- (225) Vlasak, R.; Klueppel, I.; Grundmeier, G. Combined EIS and FTIR-ATR Study of Water Uptake and Diffusion in Polymer Films on Semiconducting Electrodes. *Electrochim. Acta* **2007**, *52* (28), 8075–8080.
- (226) Kuramitz, H.; Piruska, A.; Halsall, H. B.; Seliskar, C. J.; Heineman, W. R. Spectroelectrochemical Sensing of the Interaction between Protein and Its Ligand Using the Redox Dye Nile Blue as a Label. *Anal. Chem.* **2008**, *80* (24), 9642–9648.
- (227) Beam, B. M.; Armstrong, N. R.; Mendes, S. B. An Electroactive Fiber Optic Chip for Spectroelectrochemical Characterization of Ultra-Thin Redox-Active Films. *Analyst* **2009**, *134* (3), 454–459.
- (228) Healy, A. J.; Reeve, H. A.; Vincent, K. a. Development of an Infrared Spectroscopic Approach for Studying Metalloenzyme Active Site Chemistry under Direct Electrochemical Control. *Faraday Discuss.* **2011**, *148*, 345.
- (229) Ash, P. A.; Vincent, K. A. Spectroscopic Analysis of Immobilised Redox Enzymes under Direct Electrochemical Control. *Chem. Commun.* **2012**, *48* (10), 1400–1409.
- (230) Kellenberger, A.; Dmitrieva, E.; Dunsch, L. Structure Dependence of Charged States in “Linear” Polyaniline as Studied by In Situ ATR-FTIR Spectroelectrochemistry. *J. Phys. Chem. B* **2012**.
- (231) Purushothaman, B. K.; Pelsozy, M.; Morrison, P. W.; Lvovich, V. F.; Martin, H. B. In Situ Infrared Attenuated Total Reflectance Spectroelectrochemical Study of Lubricant Degradation. *J. Appl. Electrochem.* **2012**, *42* (2), 111–120.
- (232) Healy, A. J.; Ash, P. A.; Lenz, O.; Vincent, K. A. Attenuated Total Reflectance Infrared Spectroelectrochemistry at a Carbon Particle Electrode; Unmediated Redox Control of a [NiFe]-hydrogenase Solution. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15* (19), 7055–7059.
- (233) Régis, A.; Hapiot, P.; Servagent-Noinville, S. Detection of Short-Lived Electrogenerated Species by Raman Microspectrometry. *Anal. Chem.* **2000**, *72* (10), 2216–2221.
- (234) Aliev, A. R.; Gafurov, M. M. Vibrational Spectra of the Molten Nitrate/Platinum Electrode Interfacial Region. *Russ. J. Electrochem.* **2001**, *37* (5), 536–540.
- (235) Luo, H.; Weaver, M. J. A Versatile Surface Raman Spectroelectrochemical Flow Cell: Applications to Chemisorbate Kinetics. *J. Electroanal. Chem.* **2001**, *501* (1-2), 141–150.

- (236) Simard, S.; Odziemkowski, M.; Irish, D. E.; Brossard, L.; Ménard, H. In Situ Micro-Raman Spectroscopy to Investigate Pitting Corrosion Product of 1024 Mild Steel in Phosphate and Bicarbonate Solutions Containing Chloride and Sulfate Ions. *J. Appl. Electrochem.* **2001**, *31* (8), 913–920.
- (237) Brolo, A. G.; Odziemkowski, M.; Porter, J.; Irish, D. E. In Situ Micro Raman Investigation of Electrochemically Formed Halide and Pseudohalide Films on Mercury Electrodes. *J. Raman Spectrosc.* **2002**, *33* (3), 136–141.
- (238) Brolo, A. G.; Germain, P.; Hager, G. Investigation of the Adsorption of L -Cysteine on a Polycrystalline Silver Electrode by Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) and Surface-Enhanced Second Harmonic Generation (SESHG). *J. Phys. Chem.* **2002**, *106* (23), 5982–5987.
- (239) Damlin, P.; Kvarnström, C.; Petr, a.; Ek, P.; Dunsch, L.; Ivaska, a. In Situ Resonant Raman and ESR Spectroelectrochemical Study of Electrochemically Synthesized Poly(p-Phenylenevinylene). *J. Solid State Electrochem.* **2002**, *6* (5), 291–301.
- (240) Latonen, R. M.; Kvarnström, C.; Ivaska, A. A Spectroelectrochemical Study on Electrochemically Synthesized Poly(thienyl biphenyl) Film. *Synth. Met.* **2002**, *129* (2), 135–145.
- (241) Vuk, A. Š.; Orel, B.; Colombari, P. In-Situ Resonance Raman Measurements of a Hybrid Electrochromic Cell with a Gel Redox (I<sup>3</sup>-/I<sup>-</sup>) Electrolyte. *Acta Chim. Slov.* **2003**, *50*, 601–618.
- (242) Nowak, A. M.; McCreery, R. L. In Situ Raman Spectroscopy of Bias-Induced Structural Changes in Nitroazobenzene Molecular Electronic Junctions. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (50), 16621–16631.
- (243) Gómez, R.; Pérez, J. M.; Solla-Gullón, J.; Montiel, V.; Aldaz, A. In Situ Surface Enhanced Raman Spectroscopy on Electrodes with Platinum and Palladium Nanoparticle Ensembles. *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 9943–9949.
- (244) Lefrant, S.; Baltog, I.; Baïbarac, M. Surface-enhanced Raman Scattering Studies on Chemically Transformed Carbon Nanotube Thin Films. *J. Raman Spectrosc.* **2005**, *36* , 676-698.
- (245) Burba, C. M.; Frech, R. Modified Coin Cells for *In Situ* Raman Spectroelectrochemical Measurements of Li<sub>x</sub>V<sub>2</sub>O<sub>5</sub> for Lithium Rechargeable Batteries. *Appl. Spectrosc.* **2006**, *60* (5), 490–493.
- (246) Itoh, T.; Maeda, T.; Kasuya, A. In Situ Surface-enhanced Raman Scattering Spectroelectrochemistry of Oxygen Species. *Faraday Discuss.* **2006**, *132*, 95–109.
- (247) Shreepathi, S.; Holze, R. Spectroelectrochemistry and Preresonance Raman Spectroscopy of Polyaniline-Dodecylbenzenesulfonic Acid Colloidal Dispersions. *Langmuir* **2006**, *22* (11), 5196–5204.
- (248) Anema, J. R.; Brolo, A. G. The Use of Polarization-Dependent SERS from Scratched Gold Films to Selectively Eliminate Solution-Phase Interference. *Plasmonics* **2007**, *2* (3), 157–162.
- (249) Sáez, V.; Esclapez, M. D.; Bonete, P.; González-García, J.; Pérez, J. M. Spectroelectrochemical Study of Perchloroethylene Reduction at Copper Electrodes in Neutral Aqueous Medium. *Electrochim. Acta* **2008**, *53* (7), 3210–3217.
- (250) Zhou, Z. Y.; Tian, N.; Huang, Z.-Z.; Chen, D. J.; Sun, S. G. Nanoparticle Catalysts with High Energy Surfaces and Enhanced Activity Synthesized by Electrochemical Method. *Faraday Discuss.* **2008**, *140*, 81–92; discussion 93–112.

- (251) Kavan, L.; Janda, P.; Krause, M.; Ziegls, F.; Dunsch, L. Rotating Cell for in Situ Raman Spectroelectrochemical Studies of Photosensitive Redox Systems. *Anal. Chem.* **2009**, *81* (5), 2017–2021.
- (252) Zhang, L.; Liao, V.; Yu, Z. Raman Spectroelectrochemistry of a Single-Wall Carbon Nanotube Bundle. *Carbon N. Y.* **2010**, *48* (9), 2582–2589.
- (253) De Souza, R. F. B.; Teixeira Neto, É.; Calegari, M. L.; Santos, E. A.; Martinho, H. S.; Coelho dos Santos, M. Ethanol Electro-Oxidation on Pt/C Electrocatalysts: An “In Situ” Raman Spectroelectrochemical Study. *Electrocatalysis* **2011**, *2* (1), 28–34.
- (254) Królikowska, A.; Barczuk, P.; Jurczakowski, R.; Augustynski, J. The Core-shell Nature of Nanostructured WO<sub>3</sub> Photoelectrodes Demonstrated in Spectroelectrochemical Studies. *J. Electroanal. Chem.* **2011**, *662* (1), 229–239.
- (255) Murugesan, S.; Harris, J. T.; Korgel, B. A.; Stevenson, K. J. Copper-Coated Amorphous Silicon Particles as an Anode Material for Lithium-Ion Batteries. *Chem. Mater.* **2012**, *24*, 1306–1315.
- (256) Pomfret, M. B.; Pietron, J. J. A Raman Spectroelectrochemical Study of Potential-Controlled Benzenethiol Desorption from Pt-Fe Group Alloy Films. *J. Power Sources* **2012**, *212*, 212–219.
- (257) Posner, R.; Jubb, A. M.; Frankel, G. S.; Stratmann, M.; Allen, H. C. A Simultaneous Kelvin Probe and Raman Spectroscopy Approach for in Situ Surface and Interface Analysis. *Electrochim. Acta* **2012**, *83*, 327–334.
- (258) Dendisová, M.; Havránek, L.; Ončák, M.; Matějka, P. In Situ SERS Study of Azobenzene Derivative Formation from 4-Aminobenzenethiol on Gold, Silver, and Copper Nanostructured Surfaces: What Is the Role of Applied Potential and Used Metal? *J. Phys. Chem. C* **2013**, *117* (41), 21245–21253.
- (259) Dendisová-Vyškovská, M.; Kokaislová, A.; Ončák, M.; Matějka, P. SERS and *In Situ* SERS Spectroscopy of Riboflavin Adsorbed on Silver, Gold and Copper Substrates. Elucidation of Variability of Surface Orientation Based on Both Experimental and Theoretical Approach. *J. Mol. Struct.* **2013**, *1038*, 19–28.
- (260) Bassetto, V. C.; Russell, A. E.; Kubota, L. T.; Bartlett, P. N. Preparation of Copper Sphere Segment Void Templates for Electrochemical SERS and Their Use to Study the Interaction of Amino Acids with Copper under Potentiostatic Control. *Electrochim. Acta* **2014**, *144*, 400–405.
- (261) Stancovski, V.; Badilescu, S. In Situ Raman Spectroscopic-Electrochemical Studies of Lithium-Ion Battery Materials: A Historical Overview. *J. Appl. Electrochem.* **2014**, *44* (1), 23–43.
- (262) El-said, W. A.; Kim, T.; Chung, Y.; Choi, J. Biomaterials Fabrication of New Single Cell Chip to Monitor Intracellular and Extracellular Redox State Based on Spectroelectrochemical Method. *Biomaterials* **2015**, *40*, 80–87.
- (263) Yuan, T.; Le, L.; Ngoc, T.; Nieuwkastele, J. Van; Odijk, M.; Berg, A. Van Den; Permentier, H.; Bischo, R.; Carlen, E. T. In Situ Surface-Enhanced Raman Spectroelectrochemical Analysis System with a Hemin Modified Nanostructured Gold Surface. *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 2588–2592.
- (264) 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* (7), 516–521.

- (265) Klod, S.; Ziegs, F.; Dunsch, L. In Situ NMR Spectroelectrochemistry of Higher Sensitivity by Large Scale Electrodes. *Anal. Chem.* **2009**, *81* (24), 10262–10267.
- (266) Bussy, U.; Giraudeau, P.; Silvestre, V.; Jaunet-Lahary, T.; Ferchaud-Roucher, V.; Krempf, M.; Akoka, S.; Tea, I.; Boujtita, M. In Situ NMR Spectroelectrochemistry for the Structure Elucidation of Unstable Intermediate Metabolites. *Anal. Bioanal. Chem.* **2013**, *405* (17), 5817–5824.
- (267) Ferreira Gomes, B.; Silva Nunes, L. M.; Silva Lobo, C. M.; Cabeça, L. F.; Colnago, L. A. In Situ Study of the Magnetoelectrolysis Phenomenon during Copper Electrodeposition Using Time Domain NMR Relaxometry. *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 9391–9393.
- (268) 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.
- (269) Cognigni, A.; Ascone, I.; Zamponi, S.; Marassi, R. A Quasi-Solid State Electrochemical Cell for in Situ EXAFS Measurements on Biological Samples. *J. Synchrotron Radiat.* **2001**, *8* (2), 987–989.
- (270) Mcbreen, J.; Balasubramanian, M. Rechargeable Lithium-Ion Battery Cathodes : In-Situ XAS. *J. Met.* **2002**, *2*, 25–28.
- (271) Ascone, I.; Zamponi, S.; Cognigni, A.; Marmocchi, F.; Marassi, R. X-Ray Voltabsorptometry on Redox Proteins. *Electrochim. Acta* **2005**, *50* (12), 2437–2443.
- (272) Hennig, C.; Tutschku, J.; Rossberg, A.; Bernhard, G.; Scheinost, A. C. Comparative EXAFS Investigation of uranium(VI) and -(IV) Aquo Chloro Complexes in Solution Using a Newly Developed Spectroelectrochemical Cell. *Inorg. Chem.* **2005**, *44* (19), 6655–6661.
- (273) Xuan, G. S.; Jang, S.; Kwag, G.; Kim, S. Simple and Convenient Design of a Spectroelectrochemical Cell for in Situ XANES Measurements of Adsorbed Species in Transmission Mode. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2005**, *26* (4), 671–674.
- (274) Leyssens, K.; Adriaens, A.; Dowsett, M. G.; Schotte, B.; Oloff, I.; Pantos, E.; Bell, A. M. T.; Thompson, S. P. Simultaneous in Situ Time Resolved SR-XRD and Corrosion Potential Analyses to Monitor the Corrosion on Copper. *Electrochem. commun.* **2005**, *7* (12), 1265–1270.
- (275) Adriaens, A.; Dowsett, M.; Leyssens, K.; Van Gasse, B. Insights into Electrolytic Stabilization with Weak Polarization as Treatment for Archaeological Copper Objects. *Anal. Bioanal. Chem.* **2007**, *387* (3), 861–868.
- (276) Polovov, I. B.; Volkovich, V. A.; Charnock, J. M.; Kralj, B.; Lewin, R. G.; Kinoshita, H.; May, I.; Sharrad, C. A. In Situ Spectroscopy and Spectroelectrochemistry of Uranium in High-Temperature Alkali Chloride Molten Salts. *Inorg. Chem.* **2008**, *47* (17), 7474–7482.
- (277) Wiltshire, R. J. K.; Smila-Castro, O.; Connelly, N. G.; Matthews, S. M.; Fisher, A. C.; Rayment, T. Channel-Flow Cell for X-Ray Absorption Spectroelectrochemistry. *J. Phys. Chem. C* **2009**, *113* (1), 308–315.
- (278) Taylor, A. W.; Qiu, F.; Villar-Garcia, I. J.; Licence, P. Spectroelectrochemistry at Ultrahigh Vacuum: In Situ Monitoring of Electrochemically Generated Species by X-Ray Photoelectron Spectroscopy. *Chem. Commun.* **2009**, No. 39, 5817–5819.
- (279) Croze, V.; Etingshausen, F.; Melke, J.; Soehn, M.; Stuermer, D.; Roth, C. The Use of in Situ X-Ray Absorption Spectroscopy in Applied Fuel Cell Research. *J. Appl. Electrochem.* **2010**, *40* (5), 877–883.
- (280) Adriaens, A.; Dowsett, M. The Coordinated Use of Synchrotron Spectroelectrochemistry for Corrosion Studies on Heritage Metals. *Acc. Chem. Res.* **2010**, *43* (6), 927–935.

- (281) Yeo, J.; Cheah, M. H.; Bondin, M. I.; Best, S. P. X-Ray Spectroscopy and Structure Elucidation of Reactive Electrogenerated Tri-Iron Carbonyl Sulfide Clusters. *Aust. J. Chem.* **2012**, *65* (3), 241–253.
- (282) De Keersmaecker, M.; Dowsett, M.; Grayburn, R.; Banerjee, D.; Adriaens, A. In-Situ Spectroelectrochemical Characterization of the Electrochemical Growth and Breakdown of a Lead Dodecanoate Coating on a Lead Substrate. *Talanta* **2015**, *132*, 760–768.
- (283) Rapta, P.; Fáber, R.; Dunsch, L.; Neudeck, A.; Nuyken, O. In Situ EPR and UV-Vis Spectroelectrochemistry of Hole-Transporting Organic Substrates. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2000**, *56* (2), 357–362.
- (284) Dag, Ö.; Yaman, S. Ö.; Önal, A. M.; Isci, H. Spectroelectrochemistry of Potassium Ethylxanthate, bis(ethylxanthato)nickel(II) and Tetraethylammonium tris(ethylxanthato)nickelate(II). *J. Chem. Soc. Dalt. Trans.* **2001**, No. 19, 2819–2824.
- (285) Hinckley, G. T.; Frey, P. a. An Adaptable Spectroelectrochemical Titrator: The Midpoint Reduction Potential of the Iron-Sulfur Center in Lysine 2,3-Aminomutase. *Anal. Biochem.* **2006**, *349* (1), 103–111.
- (286) Tarábek, J.; Kavan, L.; Kalbáč, M.; Rapta, P.; Zukalová, M.; Dunsch, L. In Situ EPR Spectroelectrochemistry of Single-Walled Carbon Nanotubes and C60 Fullerene Peapods. *Carbon N. Y.* **2006**, *44* (11), 2147–2154.
- (287) Zeitouny, J.; Jouikov, V. Reversed Redox Generation of Silyl Radicals in a Four-Electrode Flow-through EPR Spectroelectrochemical Cell. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2009**, *11* (33), 7161–7170.
- (288) Murray, P. R.; Collison, D.; Daff, S.; Austin, N.; Edge, R.; Flynn, B. W.; Jack, L.; Leroux, F.; McInnes, E. J. L.; Murray, A. F.; Sells, D.; Stevenson, T.; Wolowska, J.; Yellowlees, L. J. An in Situ Electrochemical Cell for Q- and W-Band EPR Spectroscopy. *J. Magn. Reson.* **2011**, *213* (1), 206–209.
- (289) Clayton, D. A.; Benoist, D. M.; Zhu, Y.; Pan, S. Photoluminescence and Nanowires. *ACS Nano* **2010**, *4* (4), 2363–2373.
- (290) Jacobsson, T. J.; Edvinsson, T. A Spectroelectrochemical Method for Locating Fluorescence Trap States in Nanoparticles and Quantum Dots. *J. Phys. Chem. C* **2013**, *117* (10), 5497–5504.
- (291) Wang, S. T.; Zhegalova, N. G.; Gustafson, T. P.; Zhou, A.; Sher, J.; Achilefu, S.; Berezin, O. Y.; Berezin, M. Y. Sensitivity of Activatable Reactive Oxygen Species Probes by Fluorescence Spectroelectrochemistry. *Analyst* **2013**, *138* (15), 4363–4369.
- (292) Łapkowski, M.; Data, P.; Nowakowska-Oleksy, A.; Soloduch, J.; Roszak, S. Electrochemical Characterization of Alternate Conducting Carbazole-Bisthiophene Units. *Mater. Chem. Phys.* **2012**, *131* (3), 757–763.
- (293) 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* (14), 3330–3335.
- (294) Jennings, P.; Jones, A. C.; Mount, A. R. In Situ Spectroelectrochemical Studies of the Fluorescence of 5-substituted Indole Trimer Films. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2000**, *2* (6), 1241–1248.
- (295) Nagatani, H.; Iglesias, R. a.; Fermín, D. J.; Brevet, P. F.; Girault, H. H. Adsorption Behavior of Charged Zinc Porphyrins at the water/1,2-Dichloroethane Interface Studied by Potential Modulated Fluorescence Spectroscopy. *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104* (29), 6869–6876.

- (296) Dasgupta, P. K.; Eom, I.; Morris, K. J.; Li, J. Light Emitting Diode-Based Detectors Absorbance, Fluorescence and Spectroelectrochemical Measurements in a Planar Flow-through Cell. *Anal. Chim. Acta* **2003**, *500* (1-2), 337–364.
- (297) Bizzotto, D.; Yang, Y.; Shepherd, J. L.; Stoodley, R.; Agak, J.; Stauffer, V.; Lathuilière, M.; Akhtar, A. S.; Chung, E. Electrochemical and Spectroelectrochemical Characterization of Lipid Organization in an Electric Field. *J. Electroanal. Chem.* **2004**, *574* (1), 167–184.
- (298) Burba, C. M.; Frech, R. In Situ Transmission FTIR Spectroelectrochemistry: A New Technique for Studying Lithium Batteries. *Electrochim. Acta* **2006**, *52* (3), 780–785.
- (299) Bellec, V.; De Backer, M. G.; Levillain, E.; Sauvage, F. X.; Sombret, B.; Wartelle, C. In Situ Time-Resolved FTIR Spectroelectrochemistry: Study of the Reduction of TCNQ. *Electrochem. commun.* **2001**, *3* (9), 483–488.
- (300) Yohannes, T.; Lattante, S.; Neugebauer, H.; Sariciftci, N. S.; Andersson, M. In Situ FTIR Spectroelectrochemical Characterization of N- and P-Dopable Phenyl-Substituted Polythiophenes. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2009**, *11* (29), 6283–6288.
- (301) Mucalo, M. R.; Li, Q. In Situ Infrared Spectroelectrochemical Studies of the Corrosion of a Nickel Electrode as a Function of Applied Potential in Cyanate, Thiocyanate, and Selenocyanate Solutions. *J. Colloid Interface Sci.* **2004**, *269* (2), 370–380.
- (302) Liu, P.; Jin, B.; Cheng, F. A Low Temperature in Situ Infrared Reflected Absorbance Spectroelectrochemical (LT IRRAS) Cell. *J. Electroanal. Chem.* **2007**, *603* (2), 269–274.
- (303) Seshadri, G.; Mo, H.; Kelber, J. A. Spectroelectrochemical Studies of Nickel Oxidation in Aerated Phosphate Solutions. *Lagmuir* **2000**, *16*, 6037–6042.
- (304) 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* (1), 251–256.
- (305) Zavarine, I. S.; Kubiak, C. P. A Versatile Variable Temperature Thin Layer Reflectance Spectroelectrochemical Cell. *J. Electroanal. Chem.* **2001**, *495* (2), 106–109.
- (306) Dias, M.; Hudhomme, P.; Levillain, E.; Perrin, L.; Sahin, Y.; Sauvage, F. X.; Wartelle, C. Electrochemistry Coupled to Fluorescence Spectroscopy: A New Versatile Approach. *Electrochem. commun.* **2004**, *6* (3), 325–330.
- (307) Debiemme-Chouvy, C.; Wartelle, C.; Sauvage, F. X. First Evidence of the Oxidation and Regeneration of Polysulfides at a GaAs Electrode, under Anodic Conditions. A Study by in Situ UV-Visible Spectroelectrochemistry. *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108* (47), 18291–18296.
- (308) Borg, S. J.; Best, S. P. Spectroelectrochemical Cell for the Study of Interactions between Redox-Activated Species and Moderate Pressures of Gaseous Substrates. *J. Electroanal. Chem.* **2002**, *535* (1-2), 57–64.
- (309) Shi, P.; Scherson, D. A. Diffusion Boundary Layer of a Rotating Disk Electrode as a Thin-Layer Spectroelectrochemical Cell. *Anal. Chem.* **2004**, *76* (8), 2398–2400.
- (310) Bernad, S.; Mäntele, W. An Innovative Spectroelectrochemical Reflection Cell for Rapid Protein Electrochemistry and Ultraviolet/Visible/Infrared Spectroscopy. *Anal. Biochem.* **2006**, *351* (2), 214–218.
- (311) Muñoz, E.; Colina, Á.; Heras, A.; Ruiz, V.; Palmero, S.; López-Palacios, J. Electropolymerization and Characterization of Polyaniline Films Using a Spectroelectrochemical Flow Cell. *Anal. Chim. Acta* **2006**, *573-574*, 20–25.

- (312) Schroll, C. A.; Chatterjee, S.; Heineman, W. R.; Bryan, S. A. Semi-Infinite Linear Diffusion Spectroelectrochemistry on an Aqueous Micro-Drop. *Anal. Chem.* **2011**, *83* (11), 4214–4219.
- (313) Flowers, P. A.; Blake, D. A. Submicroliter Electrochemistry and Spectroelectrochemistry Using Standard Electrodes and a Polymer Electrolyte Salt Bridge. *Anal. Chem.* **2013**, *85* (6), 3059–3063.
- (314) Haymond, S.; Zak, J. K.; Show, Y.; Butler, J. E.; Babcock, G. T.; Swain, G. M. Spectroelectrochemical Responsiveness of a Freestanding, Boron-Doped Diamond, Optically Transparent Electrode toward Ferrocene. *Anal. Chim. Acta* **2003**, *500* (1-2), 137–144.
- (315) 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* (17), 2479–2486.
- (316) Nowicka, A. M.; Zabost, E.; Donten, M.; Mazerska, Z.; Stojek, Z. Electrooxidation of Dissolved dsDNA Backed by *In Situ* UV-Vis Spectroscopy. *Bioelectrochemistry* **2007**, *70* (2), 440–445.
- (317) Matis, M.; Rapta, P.; Lukes, V.; Hartmann, H.; Dunsch, L. Highly Charged Cations from N,N,N',N'-tetrakis(4-Aminophenyl)benzidine and Its N,N,N',N'-tetrakis(4-Methoxyphenyl)-Substituted Homologue Studied by Thin-Layer *In Situ* Electron Spin resonance/UV-Vis-NIR Spectroelectrochemistry. *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114* (13), 4451–4460.
- (318) León, L.; Maraver, J. J.; Carbajo, J.; Mozo, J. D. Simple and Multi-Configurational Flow-Cell Detector for UV-vis Spectroelectrochemical Measurements in Commercial Instruments. *Sensors Actuators B Chem.* **2013**, *186*, 263–269.
- (319) Yu, J. S.; Yang, C.; Fang, H.-Q. Variable Thickness Thin-Layer Cell for Electrochemistry and *In Situ* UV-VIS Absorption, Luminescence and Surface-Enhanced Raman Spectroelectrochemistry. *Anal. Chim. Acta* **2000**, *420* (1), 45–55.
- (320) Larsson, T.; Lindgren, A.; Ruzgas, T. Spectroelectrochemical Study of Cellobiose Dehydrogenase and Diaphorase in a Thiol-Modified Gold Capillary in the Absence of Mediators. *Bioelectrochemistry* **2001**, *53* (2), 243–249.
- (321) Christenson, A.; Dock, E.; Gorton, L.; Ruzgas, T. Direct Heterogeneous Electron Transfer of Theophylline Oxidase. *Biosens. Bioelectron.* **2004**, *20* (2), 176–183.
- (322) Daniel, D.; Gutz, I. G. R.; Paulo, Ä.; Prof, A.; Prestes, L. Long-Optical-Path Thin-Layer Spectroelectrochemical Flow Cell with Inexpensive Gold Electrodes. *Electroanalysis* **2001**, *13* (8-9), 681–685.
- (323) Daniel, D.; Gutz, I. G. R. Flow Injection Spectroelectroanalytical Method for the Determination of Promethazine Hydrochloride in Pharmaceutical Preparations. *Anal. Chim. Acta* **2003**, *494* (1-2), 215–224.
- (324) Angnes, L.; Richter, E. M.; Augelli, M. A.; Kume, G. H. Gold Electrodes from Recordable CDs. *Anal. Chem.* **2000**, *72* (21), 5503–5506.
- (325) Richter, E. M.; Augelli, M. A.; Kume, G. H.; Mioshi, R. N.; Angnes, L. Gold Electrodes from Recordable CDs for Mercury Quantification by Flow Injection Analysis. *Fresenius. J. Anal. Chem.* **2000**, *366* (5), 444–448.
- (326) Heras, A.; Colina, Á.; Ruiz, V.; López-Palacios, J. UV-Visible Spectroelectrochemical Detection of Side-Reactions in the Hexacyanoferrate(III)/(II) Electrode Process. *Electroanalysis* **2003**, *15* (8), 702–708.

- (327) López-Palacios, J.; Colina, Á.; Heras, A.; Ruiz, V.; Fuente, L.; Colina, Á.; Heras, A.; Ruiz, V.; Fuente, L. Bidimensional Spectroelectrochemistry. *Anal. Chem.* **2001**, *73* (13), 2883–2889.
- (328) Isago, H. A New Spectroelectrochemical Cell with a Long Optical Path Length for Redox Studies of Phthalocyanines. *J. Porphy. Phthalocyanines* **2006**, *10* (09), 1125–1131.
- (329) Flowers, P. A.; Arnett, K. A. Fiber Optic Spectroelectrochemical Sensing for in Situ Determination of Metal Ions. *Spectrosc. Lett.* **2007**, *40* (3), 501–511.
- (330) Martínez, A.; Colina, Á.; Dryfe, R. A. W.; Ruiz, V. Spectroelectrochemistry at the Liquid|Liquid Interface: Parallel Beam UV–Vis Absorption. *Electrochim. Acta* **2009**, *54*, 5071–5076.
- (331) Hill, S. S.; Dryfe, R. A. W.; Roberts, E. P. L.; Fisher, A. C.; Yunus, K. Hydrodynamic Study of Ion Transfer at the Liquid/Liquid Interface: The Channel Flow Cell. *Anal. Chem.* **2003**, *75* (3), 486–493.
- (332) Flowers, P. A.; Strickland, J. C. Easily Constructed Microscale Spectroelectrochemical Cell. *Spectrosc. Lett.* **2010**, *43* (7-8), 528–533.
- (333) Velický, M.; Tam, K. Y.; Dryfe, R. A. W. Permeation of a Fully Ionized Species across a Polarized Supported Liquid Membrane. *Anal. Chem.* **2012**, *84* (5), 2541–2541.
- (334) Velický, M.; Bradley, D. F.; Tam, K. Y.; Dryfe, R. A. W. In Situ Artificial Membrane Permeation Assay under Hydrodynamic Control: Permeability-pH Profiles of Warfarin and Verapamil. *Pharm. Res.* **2010**, *27* (8), 1644–1658.
- (335) Brisendine, J. M.; Mutter, A. C.; Cerda, J. F.; Koder, R. L. A Three-Dimensional Printed Cell for Rapid, Low-Volume Spectroelectrochemistry. *Anal. Biochem.* **2013**, *439* (1), 1–3.
- (336) 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.
- (337) Seeber, R.; Campi, V. G. Bidimensional Spectroelectrochemistry Applied to the Electrosynthesis and Characterization of Conducting Polymers: *Helv. Chim. Acta* **2001**, *84*, 3628–3642.
- (338) Orcajo, O.; Ventosa, E.; Martínez, A.; Colina, Á.; Heras, A.; Ruiz, V.; López-Palacios, J. A New Reflection–Transmission Bidimensional Spectroelectrochemistry Cell: Electrically Controlled Release of Chemicals from a Conducting Polymer. *J. Electroanal. Chem.* **2006**, *596* (2), 95–100.
- (339) 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* (24), 10838–10844.
- (340) Xia, Y.; Xiong, Y.; Lim, B.; Skrabalak, S. E. Shape-Controlled Synthesis of Metal Nanocrystals: Simple Chemistry Meets Complex Physics? *Angew. Chemie* **2009**, *48*, 60–103.
- (341) Sun, Y.; Xia, Y. Shape-Controlled Synthesis of Gold and Silver Nanoparticles. *Science* **2002**, *298* (5601), 2176–2179.
- (342) Rycenga, M.; Cogley, C. M.; Zeng, J.; Li, W.; Moran, C. H.; Zhang, Q.; Qin, D.; Xia, Y. Controlling the Synthesis and Assembly of Silver Nanostructures for Plasmonic Applications. *Chem. Rev.* **2011**, *111* (6), 3669–3712.
- (343) Tian, N.; Zhou, Z. Y.; Yu, N. F.; Wang, L. Y.; Sun, S. G. Direct Electrodeposition of Tetrahedral Pd Nanocrystals with High-Index Facets and High Catalytic Activity for Ethanol Electrooxidation. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132* (22), 7580–7581.



- (344) Chen, Y. X.; Chen, S. P.; Zhou, Z. Y.; Tian, N.; Jiang, Y. X.; Sun, S. G.; Ding, Y.; Zhong, L. W. Tuning the Shape and Catalytic Activity of Fe Nanocrystals from Rhombic Dodecahedra and Tetragonal Bipyramids to Cubes by Electrochemistry. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (31), 10860–10862.
- (345) Platt, M.; Dryfe, R. A. W. Electrodeposition at the Liquid/Liquid Interface: The Chronoamperometric Response as a Function of Applied Potential Difference. *J. Electroanal. Chem.* **2007**, *599* (2), 323–332.
- (346) Platt, M.; Dryfe, R. A. W.; Roberts, E. P. L. Controlled Deposition of Nanoparticles at the Liquid-Liquid Interface. *Chem. Commun.* **2002**, No. 20, 2324–2325.
- (347) Platt, M.; Dryfe, R. A. W.; Roberts, E. P. L. Electrodeposition of Palladium Nanoparticles at the Liquid-Liquid Interface Using Porous Alumina Templates. *Electrochim. Acta* **2003**, *48* (20-22), 3037–3046.
- (348) Ruiz, V.; Colina, Á.; Heras, A.; López-Palacios, J. UV/Vis Spectroelectrochemical Evidence of Rectification of Quantized Charging in Monolayer-Protected Gold Cluster Films. *Small* **2006**, *2* (1), 56–58.
- (349) Andria, S. E.; Seliskar, C. J.; Heineman, W. R. Spectroelectrochemical Sensing Based on Multimode Selectivity Simultaneously Achievable in a Single Device. 21. Selective Chemical Sensing Using Sulfonated Polystyrene-Blockpoly(ethylene-Ran-Butylene) block-Polystyrene Thin Films. *Anal. Chem.* **2009**, *81* (23), 9599–9606.
- (350) Cheng, Y.; Schiffrin, D. J. Electrodeposition of Metallic Gold Clusters at the water/1,2-Dichloroethane Interface. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **1996**, *92* (1), 3865–3871.
- (351) Ding, Z.; Fermin, D. J.; Brevet, P. F.; Girault, H. H. Spectroelectrochemical Approaches to Heterogeneous Electron Transfer Reactions at the Polarised Water 1,2-Dichloroethane Interfaces. *J. Electroanal. Chem.* **1998**, *458*, 139–148.
- (352) Ding, Z.; Wellington, R. G.; Brevet, P. F.; Girault, H. H. Spectroelectrochemical Studies of Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> at the Water/1,2-Dichloroethane Interface. *J. Phys. Chem.* **1996**, *100* (25), 10658–10663.
- (353) Ding, Z.; Wellington, R. G.; Brevet, P.; Girault, H. H. Differential Cyclic Voltabsorptometry and Chronoabsorptometry Studies of Ion Transfer Reactions at the water|1,2-Dichloroethane Interface. *J. Electroanal. Chem.* **1997**, *420*, 35–41.
- (354) Martínez, A.; Colina, Á.; Dryfe, R. A. W.; Ruiz, V. Spectroelectrochemistry at the Liquid/Liquid Interface: Parallel Beam UV-Vis Absorption. *Electrochim. Acta* **2009**, *54* (22), 5071–5076.
- (355) Jan, C. C.; McCreery, R. L.; Gamble, F. T. Diffusion Layer Imaging: Spatial Resolution of Electrochemical. *Anal. Chem.* **1985**, *57* (8), 1763–1765.
- (356) Pruiksmá, R.; McCreery, R. L. Observation of Electrochemical Concentration Profiles by Absorption Spectroelectrochemistry. *Anal. Chem.* **1979**, *51* (13), 2253–2257.
- (357) Olbrich-Stock, M.; Posdorfer, J.; Schindler, R. N. UV-Visible Spectroscopic Studies in the Diffusion Layer during Electropolymerization of Thiophene. *J. Electroanal. Chem.* **1994**, *368* (1-2), 173–181.
- (358) Posdorfer, J.; Olbrich-Stock, M.; Schindler, R. N. Spatially Resolved UV-VIS Absorption Measurements in Planar, Cylindrical and Spherical Diffusion Layers. Kinetic Investigations of a Heterogeneous Electron Transfer Reaction. *Electrochim. Acta* **1994**, *39* (13), 2005–2013.
- (359) Amatore, C.; Chovin, A.; Garrigue, P.; Servant, L.; Sojic, N.; Szunerits, S.; Thouin, L. Remote Fluorescence Imaging of Dynamic Concentration Profiles with Micrometer Resolution Using a Coherent Optical Fiber Bundle. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 7202–7210.

- (360) Garay, F.; Barbero, C. A. Charge Neutralization Process of Mobile Species at any Distance from the Electrode/Solution Interface. 1. Theory and Simulation of Concentration and Concentration Gradients Developed during Potentiostatic Conditions. *Anal. Chem.* **2006**, *78* (19), 6733–6739.
- (361) Garay, F.; Barbero, C. A. Charge Neutralization Process of Mobile Species at any Distance from the Electrode/solution Interface. 2. Concentration Gradients during Potential Pulse Experiments. *Anal. Chem.* **2006**, *78* (19), 6740–6746.
- (362) Gyurcsányi, R. E.; Lindner, E. Spectroelectrochemical Microscopy: Spatially Resolved Spectroelectrochemistry of Carrier-Based Ion-Selective Membranes. *Anal. Chem.* **2005**, *77* (7), 2132–2139.
- (363) Fermín, D. J.; Duong, H. D.; Ding, Z.; Brevet, P.-F.; Girault, H. H. Photoinduced Electron Transfer at Liquid/liquid Interfaces Part II. A Study of the Electron Transfer and Recombination Dynamics by Intensity Modulated Photocurrent Spectroscopy (IMPS). *Phys. Chem. Chem. Phys.* **1999**, *1*, 1461–1467.
- (364) Colina, Á.; López-Palacios, J.; Heras, A.; Ruiz, V.; Fuente, L. Digital Simulation Model for Bidimensional Spectroelectrochemistry. *J. Electroanal. Chem.* **2003**, *553*, 87–95.
- (365) Kaneko, M.; Mochizuki, N.; Suzuki, K.; Shiroishi, H.; Ishikawa, K. Molecular Reactor for Solution Chemistry. *Chem. Lett.* **2002**, *5*, 530–531.
- (366) Crumbliss, A. L.; Perine, S. C.; Edwards, A. K.; Rillema, D. P. Characterization of Carrageenan Hydrogel Electrode Coatings with Immobilized Cationic Metal Complex Redox Couples. *J. Phys. Chem.* **1992**, *96* (3), 1388–1394.
- (367) Johans, C.; Lahtinen, R.; Kontturi, K.; Schiffrin, D. J. Nucleation at Liquid|Liquid Interfaces: Electrodeposition without Electrodes. *J. Electroanal. Chem.* **2000**, *488* (2), 99–109.
- (368) Gregory, A. J.; Levason, W.; Nofle, R. E.; Penven, R. Le; Pletcher, D. Studies of Platinum Electroplating Baths Part III . The Electrochemistry of  $\text{Pt}(\text{NH}_3)_{4-x}(\text{H}_2\text{O})_x^{2+}$  and  $\text{PtCl}_{4-x}(\text{H}_2\text{O})_x^{(2-x)-}$ . *J. Electroanal. Chem.* **1995**, *399*, 105–113.
- (369) Michaelis, M.; Henglein, A. Reduction of Pd(II) in Aqueous Solution: Stabilization and Reactions of an Intermediate Cluster and Pd Colloid Formation. *J. Phys. Chem.* **1992**, *96* (11), 4719–4724.
- (370) Lin, Y.; Skaff, H.; Emrick, T.; Dinsmore, A. D.; Russell, T. P. Nanoparticle Assembly and Transport at Liquid-Liquid Interfaces. *Science*. **2003**, *299*, 226–229.
- (371) Martínez de Pedro, A. Síntesis Electroquímica Y Caracterización de Nanopartículas Metálicas Mediante Técnicas Multirrespuesta, Universidad de Burgos, 2011.
- (372) Lançon, D.; Kadish, K. M. Electrochemical and Spectral Characterization of Iron Mono- and Dinitrosyl Porphyrins. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105* (17), 5610–5617.
- (373) Paulson, S. C.; Elliott, C. M. A Fast-Response, UV-Visible Optically Transparent Thin-Layer Cell for Potential Scan Spectroelectrochemistry. *Anal. Chem.* **1996**, *68* (10), 1711–1716.
- (374) Lapkowski, M.; Strojek, J. W. Spectroelectrochemical Investigations of the Mechanism of the Electro-Oxidation of 3,3'-Dimethylnaphthidine. *J. Electroanal. Chem.* **1985**, *182* (2), 315–333.
- (375) Flowers, P. A.; Mamantov, G. Thin-Layer Transmittance Cell for Infrared Spectroelectrochemistry. *Anal. Chem.* **1989**, *61* (2), 190–192.

- (376) Deputy, A.; Wu, H.; McCreery, R. L. Spatially Resolved Spectroelectrochemical Examination of the Oxidation of Dopamine by Chlorpromazine Cation Radical. *J. Phys. Chem.* **1990**, *94* (9), 3620–3624.
- (377) Niemz, A.; Imbriglio, J.; Rotello, V. M. Model Systems for Flavoenzyme Activity: One- and Two-Electron Reduction of Flavins in Aprotic Hydrophobic Environments. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119* (5), 887–892.
- (378) Keeseey, R. L.; Ryan, M. D. Use of Evolutionary Factor Analysis in the Spectroelectrochemistry of Escherichia Coli Sulfite Reductase Hemoprotein and a Mo/Fe/S Cluster. *Anal. Chem.* **1999**, *71* (9), 1744–1752.
- (379) Meunier-Prest, R.; Lamblin, G.; Mailfert, A.; Ra, S.; Raveau, S. In Situ Spectroelectrochemical Study of the Reductive Coupling of Benzaldehyde Catalyzed by Ti(III) Complexes in the Presence of Mg(II). *J. Electroanal. Chem.* **2003**, *541*, 175–183.
- (380) Papadopoulos, C. D.; Hatzidimitriou, A. G.; Voutsas, G. P.; Lalia-Kantouri, M. Synthesis and Characterization of New Addition Compounds of Bis(substituted-Salicylaldehyde) cobalt(II) with 2,2'-bipyridine (bipy). Crystal and Molecular Structures of  $[\text{Co}^{\text{II}}(3\text{-methoxy-salicylaldehyde})_2(\text{bipy})] \cdot \text{CH}_3\text{OH}$  (1) and  $[\text{Co}^{\text{II}}(\text{bipy})_3]\text{Br}_2 \cdot 0.5(5\text{-chlorosalicylaldehydeH}) \cdot 1.5\text{CH}_3\text{OH}$  (5). *Polyhedron* **2007**, *26* (5), 1077–1086.
- (381) Pessoa Costa, J.; Cavaco, I.; Correia, I.; Tomaz, I.; Duarte, T.; Matias, P. M. Oxovanadium(IV) Complexes with Aromatic Aldehydes. *J. Inorg. Biochem.* **2000**, *80* (1-2), 35–39.
- (382) González-Baró, A. C.; Pis-Diez, R.; Franca, C. A.; Torre, M. H.; Parajón-Costa, B. S. Physicochemical Characterization of Cu(II) Complexes with SOD-like Activity, Theoretical Studies and Biological Assays. *Polyhedron* **2010**, *29* (3), 959–968.
- (383) Li, Q.; Batchelor-McAuley, C.; Compton, R. G. Electrooxidative Decarboxylation of Vanillylmandelic Acid: Voltammetric Differentiation between the Structurally Related Compounds Homovanillic Acid and Vanillylmandelic Acid. *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114*, 9713–9719.
- (384) Constant, S.; Robitzer, M.; Quignard, F.; Di Renzo, F. Vanillin Oligomerization as a Model of Side Reactions in Lignin Fragmentation. *Catal. Today* **2012**, *189* (1), 123–128.
- (385) Becke, A. D. Density-Functional Thermochemistry. III. The Role of Exact Exchange. *J. Chem. Phys.* **1993**, *98* (7), 5648–5652.
- (386) Lee, C.; Yang, W.; G., P. R. Development of the Colle-Salvetti Correlation-Energy Formula into a Functional of the Electron Density. *J. Chem. Phys.* **1988**, *37* (2), 785–789.
- (387) Dunning, T. H. Gaussian Basis Sets for Use in Correlated Molecular Calculations. I. The Atoms Boron through Neon and Hydrogen. *J. Chem. Phys.* **1989**, *90* (2), 1007–1023.
- (388) Kendall, R. A.; Dunning, T. H.; Harrison, R. J. Electron Affinities of the First-Row Atoms Revisited. Systematic Basis Sets and Wave Functions. *J. Chem. Phys.* **1992**, *96* (9), 6796–6806.
- (389) Miertus, S.; Scrocco, E.; Tomasi, J. Electrostatic Interaction of a Solute with a Continuum. A Direct Utilization of Ab Initio Molecular Potentials for the Prevision of Solvent Effects. *Chem. Phys.* **1981**, *55*, 117–129.
- (390) Miertus, S.; Tomasi, J. Approximate Evaluations of the Electrostatic Free Energy and Internal Energy Changes in Solution Processes. *Chem. Phys.* **1982**, *65*, 239–245.
- (391) Casida, M. E.; Jamorski, C.; Casida, K. C.; Salahub, D. R. Molecular Excitation Energies to High-Lying Bound States from Time-Dependent Density-Functional Response Theory: Characterization and Correction of the Time-Dependent Local Density Approximation Ionization Threshold. *J. Chem. Phys.* **1998**, *108* (11), 4439–4449.

- (392) Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; J. A. Montgomery, Jr., T. V.; Kudin, K. N.; Burant, J. C.; Millam, J. M.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Barone, V.; Mennucci, B.; Cossi, M.; Scalmani, G.; Rega, N.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Klene, M.; Li, X.; Knox, J. E.; Hratchian, H. P.; Cross, J. B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Ayala, P. Y.; Morokuma, K.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Zakrzewski, V. G.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Strain, M. C.; Farkas, O.; Malick, D. K.; Rabuck, A. D.; Raghavachari, K.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cui, Q.; Baboul, A. G.; Clifford, S.; Cioslowski, J.; Stefanov, B. B.; Liu, G.; Liashenko, A.; Piskorz, P.; Komaromi, I.; Martin, R. L.; Fox, D. J.; Keith, T.; Al-Laham, M. A.; Peng, C. Y.; Nanayakkara, A.; Challacombe, M.; Gill, P. M. W.; Johnson, B.; Chen, W.; Wong, M. W.; Gonzalez, C.; Pople, J. A. Gaussian 03 Revision D.01. Gaussian Inc, Wallingford CT 2004, p Gaussian Inc, Wallingford CT.
- (393) Izquierdo, D.; Martinez, A.; Heras, A.; López-Palacios, J.; Ruiz, V.; Dryfe, R. A. W.; Colina, Á. Spatial Scanning Spectroelectrochemistry. Study of the Electrodeposition of Pd Nanoparticles at the Liquid/Liquid Interface. *Anal. Chem.* **2012**, *84* (13), 5723–5730.
- (394) Sawyer, D. T.; Roberts, J. L. Electrochemistry of Oxygen and Superoxide Ion in Dimethylsulfoxide at Platinum, Gold, and Mercury Electrodes. *J. Electroanal. Chem.* **1966**, *12*, 90–101.
- (395) Arudi, R. L.; Allen, A. O.; Bielski, B. H. J. Some Observations on the Chemistry of  $\text{KO}_2$ -DMSO Solutions. *FEBS Lett.* **1981**, *135* (2), 265–267.
- (396) Tai, A.; Sawano, T.; Yazama, F.; Ito, H. Evaluation of Antioxidant Activity of Vanillin by Using Multiple Antioxidant Assays. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **2011**, *1810* (2), 170–177.
- (397) Wang, R. L.; Tam, K. Y.; Marken, F.; Compton, R. G. Applications of the Channel Flow Cell for UV-Visible Spectroelectrochemical Studies Part 2. Transient Signals. *Electroanalysis* **1997**, *9* (4), 284–287.
- (398) Wang, R. L.; Tam, K. Y.; Compton, R. G. Applications of the Channel Flow Cell for UV-Visible Spectroelectrochemical Studies Part 3. Do Radical Cations and Anions Have Similar Diffusion Coefficients to Their Neutral Parent Molecules? *J. Electroanal. Chem.* **1997**, *434*, 105–114.
- (399) Durliat, H.; Courteix, A.; Comtat, M. Reactions of Horseradish Peroxidase on a Platinum Cathode. *Bioelectrochemistry Bioenerg.* **1989**, *22* (3), 197–209.
- (400) Liu, X.; Zhang, Z.; Cheng, G.; Dong, S. Spectroelectrochemical and Voltammetric Studies of L-DOPA. *Electroanalysis* **2003**, *15* (2), 103–107.
- (401) Cohen, D. J.; King, B. C.; Hawkridge, F. M. Spectroelectrochemical and Electrochemical Determination of Ligand Binding and Electron Transfer Properties of Myoglobin, Cyanomyoglobin, and Imidazolemyoglobin. *J. Electroanal. Chem.* **1998**, *447* (1998), 53–62.
- (402) Ibañez, D.; Fernández-Blanco, C.; Heras, A.; Colina, Á. Time-Resolved Study of the Surface-Enhanced Raman Scattering Effect of Silver Nanoparticles Generated in Voltammetry Experiments. *J. Phys. Chem. C* **2014**, *118* (40), 23426–23433.
- (403) Visser, H.; Curtright, A. E.; McCusker, J. K.; Sauer, K. Attenuated Total Reflection Design for in Situ FT-IR Spectroelectrochemical Studies. *Anal. Chem.* **2001**, *73* (17), 4374–4378.

- (404) Anderson, J. L. Circulating, Long-Optical-Path, Thin-Layer Electrochemical Cell for Spectroelectrochemical Characterization of Redox Enzymes. *Anal. Chem.* **1979**, *51* (14), 2312–2315.
- (405) Kuwana, T.; Strojek, J. W. Kinetic and Mechanism Studies of *o*-Tolidine Electro-Oxidation Using Optically Transparent Electrodes. *Discuss. Faraday Soc.* **1968**, *45* (3), 134–144.
- (406) Oberley, L. W.; Buettner, G. R. Role of Superoxide Dismutase in Cancer: A Review Role of Superoxide Dismutase in Cancer: A Review. *Cancer Res.* **1979**, *39*, 1141–1149.
- (407) Riley, D. P. Functional Mimics of Superoxide Dismutase Enzymes as Therapeutic Agents. *Chem. Rev.* **1999**.
- (408) Dillon, C. T.; Hambley, T. W.; Kennedy, B. J.; Lay, P. A.; Zhou, Q.; Davies, N. M.; Biffin, J. R.; Regtop, H. L. Gastrointestinal Toxicity, Antiinflammatory Activity, and Superoxide Dismutase Activity of Copper and Zinc Complexes of the Antiinflammatory Drug Indomethacin. *Chem. Res. Toxicol.* **2003**, *16*, 28–37.
- (409) Suksrichavalit, T.; Prachayasittikul, S.; Nantasenamat, C.; Isarankura-Na-Ayudhya, C.; Prachayasittikul, V. Copper Complexes of Pyridine Derivatives with Superoxide Scavenging and Antimicrobial Activities. *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, *44* (8), 3259–3265.
- (410) Dutta, S.; Padhye, S.; Mckee, V. Structural Characterization and SOD Activity of Copper–oxaprozinate. *Inorg. Chem. Commun.* **2004**, *7* (9), 1071–1074.
- (411) Naso, L.; González-Baró, A. C.; Lezama, L.; Rojo, T.; Williams, P. A. M.; Ferrer, E. G. Synthesis, Chemical Speciation and SOD Mimic Assays of Tricarballic Acid-copper(II) and Imidazole-Tricarballic Acid-copper(II) Complexes. *J. Inorg. Biochem.* **2009**, *103* (2), 219–226.
- (412) Manimaran, A.; Prabhakaran, R.; Deepa, T.; Natarajan, K.; Jayabalakrishnan, C. Synthesis, Spectral Characterization, Electrochemistry and Catalytic Activities of Cu(II) Complexes of Bifunctional Tridentate Schiff Bases Containing O-N-O Donors. *Appl. Organomet. Chem.* **2008**, *22*, 353–358.
- (413) Zhou, Y. C.; Zheng, R. L. Phenolic Compounds and an Analog as Superoxide Anion Scavengers and Antioxidants. *Biochem. Pharmacol.* **1991**, *42* (6), 1177–1179.
- (414) Odabaşoğlu, M.; Arslan, F.; Ölmez, H.; Büyükgüngör, O. Synthesis, Crystal Structures and Spectral Characterization of *trans*-bisaquabis(*o*-vanillinato)copper(II), *cis*-aquabis(*o*-vanillinato)copper(II) and aqua[bis(*o*-vanillinato)-1,2-ethylenediimin]copper(II). *Dye. Pigment.* **2007**, *75*, 507–515.
- (415) Best, S. Spectroelectrochemistry of Hydrogenase Enzymes and Related Compounds. *Coord. Chem. Rev.* **2005**, *249* (15-16), 1536–1554.
- (416) Toma, H.; Araki, K. Spectroelectrochemical Characterization of Organic and Metal-Organic Compounds. *Curr. Org. Chem.* **2002**, *6* (1), 21–34.
- (417) Tesařová, E.; Heras, A.; Colina, Á.; Ruiz, V.; Švancara, I.; Vytrás, 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* (2), 140–146.
- (418) He, J. B.; Zhou, Y.; Meng, F. S. Time-Derivative Cyclic Voltabsorptometry for Voltammetric Characterization of Catechin Film on a Carbon-Paste Electrode: One Voltammogram Becomes Four. *J. Solid State Electrochem.* **2009**, *13* (5), 679–685.
- (419) Jiang, X.; Zhang, Z.; Bai, H.; Qu, X.; Jiang, J.; Wang, E.; Dong, S. Effect of Electrode Surface Microstructure on Electron Transfer Induced Conformation Changes in Cytochrome c Monitored by in Situ UV and CD Spectroelectrochemistry. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2005**, *61* (5), 943–951.

- (420) Gui, Y. P.; Kuwana, T. Long Optical Path Length Thin-Layer Spectroelectrochemistry: Hydrogenation of Adsorbed Aromatics by Coadsorbed Hydrogen Atoms on Platinum. *Langmuir* **1986**, *2* (4), 471–476.
- (421) Brewster, J. D.; Anderson, J. L. Fiber Optic Thin-Layer Spectroelectrochemistry with Long Optical Path. *Anal. Chem.* **1982**, *54* (14), 2560–2566.
- (422) Heras, A.; Colina, Á.; 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* (2), 442–445.
- (423) Dumitrescu, I.; Unwin, P. R.; Macpherson, J. V. Electrochemistry at Carbon Nanotubes: Perspective and Issues. *Chem. Commun.* **2009**, *45*, 6886–6901.
- (424) McCreery, R. L. Advanced Carbon Electrode Materials for Molecular Electrochemistry. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 2646–2687.
- (425) Sajjadi, S.; Ghourchian, H.; Rahimi, P. Different Behaviors of Single and Multi Wall Carbon Nanotubes for Studying Electrochemistry and Electrocatalysis of Choline Oxidase. *Electrochim. Acta* **2011**, *56* (26), 9542–9548.
- (426) 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.* **2011**, *26* (5), 1876–1882.
- (427) Chekin, F.; Leiva, N.; Raoof, J. B.; Gorton, L.; Bülow, L. Direct Electrochemistry and Bioelectrocatalysis of a Class II Non-Symbiotic Plant Haemoglobin Immobilised on Screen-Printed Carbon Electrodes. *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, *398* (4), 1643–1649.
- (428) Zhang, X.; Meng, L.; Lu, Q. Cell Behaviors on Polysaccharide- Wrapped Single-Wall Carbon Nanotubes: A Quantitative Study of the Surface Properties of Biomimetic Nanofibrous Scaffolds. *ACS Nano* **2009**, *3* (10), 3200–3206.
- (429) Merkoçi, A.; Pumera, M.; Llopis, X.; Pérez, B.; Del Valle, M.; Alegret, S. New Materials for Electrochemical Sensing VI: Carbon Nanotubes. *Trends Anal. Chem.* **2005**, *24* (9), 826–838.
- (430) Feigel, I. M.; Vedala, H.; Star, A. Biosensors Based on One-Dimensional Nanostructures. *J. Mater. Chem.* **2011**, *21* (25), 8940–8954.
- (431) Garoz-Ruiz, J.; Palmero, S.; Ibañez, D.; Heras, A.; Colina, Á. Press-Transfer Optically Transparent Electrodes Fabricated from Commercial Single-Walled Carbon Nanotubes. *Electrochem. commun.* **2012**, *25* (1), 1–4.
- (432) Nematollahi, D.; Rafiee, M. Electrochemical Oxidation of Catechols in the Presence of Acetylacetone. *J. Electroanal. Chem.* **2004**, *566* (1), 31–37.
- (433) Ryan, M. D.; Yueh, A.; Chen, W. Y. The Electrochemical Oxidation of Substituted Catechols. *J. Electrochem. Soc.* **1980**, *127* (7), 1489–1495.
- (434) Albarran, G.; Boggess, W.; Rassolov, V.; Schuler, R. H. Absorption Spectrum, Mass Spectrometric Properties, and Electronic Structure of 1,2-Benzoquinone. *J. Phys. Chem. A* **2010**, *114* (28), 7470–7478.
- (435) Danzer, K.; Currie, L. A. Guidelines for Calibration in Analytical Chemistry. Part 1. Fundamentals and Single Component Calibration. *Pure Appl. Chem.* **1998**, *70* (4), 993–1014.
- (436) Ding, Y. P.; Liu, W. L.; Wu, Q. S.; Wang, X. G. Direct Simultaneous Determination of Dihydroxybenzene Isomers at C-Nanotube-Modified Electrodes by Derivative Voltammetry. *J. Electroanal. Chem.* **2005**, *575* (2), 275–280.

- (437) 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* (1), 179–185.
- (438) Peng, J.; Gao, Z. N. Influence of Micelles on the Electrochemical Behaviors of Catechol and Hydroquinone and Their Simultaneous Determination. *Anal. Bioanal. Chem.* **2006**, *384* (7-8), 1525–1532.
- (439) Li, S. J.; Qian, C.; Wang, K.; Hua, B. Y.; Wang, F. Bin; Sheng, Z. H.; Xia, X. H. Application of Thermally Reduced Graphene Oxide Modified Electrode in Simultaneous Determination of Dihydroxybenzene Isomers. *Sensors Actuators, B Chem.* **2012**, *174*, 441–448.
- (440) Naranchimeg, O.; Kim, S. K.; Jeon, S. The Modified Electrode by PEDOP with MWCNTs-Palladium Nanoparticles for the Determination of Hydroquinone and Catechol. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2011**, *32* (8), 2771–2775.
- (441) González-Diéguez, N.; Colina, Á.; López-Palacios, J.; Heras, A. Spectroelectrochemistry at Screen-Printed Electrodes: Determination of Dopamine. *Anal. Chem.* **2012**, *84* (21), 9146–9153.





**7** **APPENDIX**



Abbreviations & Acronyms	Español	English
<b>1,2-DCE</b>	1,2-dicloroetano	1,2-Dichloroethane
<b>A<sub>N</sub></b>	Absorbancia en configuración normal	Absorbance in normal arrangement
<b>A<sub>p</sub></b>	Absorbancia en configuración paralela	Absorbance in parallel arrangement
<b>ATR</b>	Reflectancia total atenuada	Attenuated total reflectance
<b>BSEC</b>	Espectroelectroquímica bidimensional	Bidimensional spectroelectrochemistry
<b>BTPPATPBF<sub>20</sub></b>	Tetrakis(pentafluoruro)fenilborato de bis(trifenilfosforaniliden)amonio	Bis(triphenylphosphoranylidene) ammonium tetrakis pentafluoroborate
<b>BuFc</b>	Butilferroceno	Butylferrocene
<b>CE</b>	Contraelectrodo	Counter electrode
<b>CI</b>	Intervalo de confianza	Confidence interval
<b>COMT</b>	Catecol-O-metiltransferasa	Catechol-O-methyltransferase
<b>Cu-<i>o</i>-Va</b>	Complejo [Cu( <i>o</i> -Va) <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> ]	[Cu( <i>o</i> -Va) <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> ] complex
<b>CV</b>	Voltamperometría cíclica	Cyclic voltammetry
<b>DCVA</b>	Voltabsorciograma derivado	Derivative voltabsorptogram
<b>EPR</b>	Resonancia paramagnética electrónica	Electron paramagnetic resonance
<b>ESR</b>	Resonancia de spin electrónico	Electron spin resonance
<b>FOSEC</b>	Espectroelectroquímica de fibra óptica	Fiber optic spectroelectrochemistry
<b>FTIR</b>	Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier	Fourier transform infrared spectroscopy
<b>IR</b>	Infrarrojo	Infrared
<b>ITIES</b>	Interfase entre dos disoluciones electrolíticas inmiscibles	Interface between two immiscible electrolyte solution
<b>ITO</b>	Óxido de indio y estaño	Indium tin oxide

<b>KelF</b>	Policlorotrifluoroetileno	Polychlorotrifluoroethene
<b>LMS</b>	Mínima mediana de cuadrados	Least median of squares
<b>LOPTLC</b>	Celda espectroelectroquímica de capa fina de largo camino óptico	Long optical path length thin-layer spectroelectrochemical cell
<b>LS</b>	Mínimos cuadrados	Least squares
<b>MVN</b>	Modelo de Verwey-Niessen Modificado	Modified Verwey-Niessen model
<b>NB</b>	Nitrobenceno	Nitrobenzene
<b>NBR</b>	Goma de nitrilo butadieno	Nitrile butadiene rubber
<b>NMR</b>	Resonancia magnética nuclear	Nuclear magnetic resonance
<b>NPs</b>	Nanopartículas	Nanoparticles
<b>OTE</b>	Electrodo ópticamente transparente	Optical transparent electrode
<b>OTTLE</b>	electrodo ópticamente activa de largo camino óptico	Optically transparent thin layer electrode
<b><i>o</i>-Va</b>	orto-vainillina 2-hidroxi-3-metoxibenzaldehido	ortho-vanillin 2-Hydroxy-3-methoxybenzaldehyde
<b>PBS</b>	Solución tampón fosfato	Phosphate buffer solution
<b>PEEK</b>	Poliéter éter cetona	Polyether ether ketone
<b>PLSR</b>	Regresión parcial por mínimos cuadrados	Partial least squares regression
<b>PMMA</b>	Polimetilmetacrilato	Poly(methyl methacrylate)
<b>PTFE</b>	Politetrafluoroetileno	Polytetrafluoroethylene
<b>PVDF</b>	Polifluoruro de vinilideno	Polyvinylidene fluoride
<b>RE</b>	Electrodo de referencia	Reference electrode
<b>SCE</b>	Electrodo saturado de calomelanos	Saturated calomel electrode
<b>Ru(bpy<sub>3</sub>)<sup>2+</sup></b>	[tris(2,2'-bipiridina)]rutenio(II)	Tris(bipyridine)ruthenium(II)
<b>SECM</b>	Microscopía electroquímica de barrido	Scanning electrochemical microscopy

<b>SFG</b>	Generación de Segundo armónico	Sum Frecuency Generation
<b>SHG</b>	Generación de suma de frecuencias	Second-Harmonic Generation
<b>SWCNT</b>	Nanotubos de carbono de pared simple	Single-walled carbon nanotubes
<b>S<sub>yx</sub></b>	Desviación estándar normal	Residual standard deviation
<b>TCNQ</b>	tetracianoquinodimetano	tetracyanoquinodimethane
<b>UV-Vis</b>	Ultravioleta-Visible	Ultravioleta-Visible
<b>VA</b>	Voltabsorciograma	Voltabsorptogram
<b>WE</b>	Electrodo de trabajo	Working electrode

