

UNIVERSITÀ DI PADOVA



FACOLTÀ DI INGEGNERIA

## TESI DI LAUREA MAGISTRALE

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN INGEGNERIA ELETTRONICA

# CARATTERIZZAZIONE SPETTROSCOPICA E MODELLIZZAZIONE ELETTRICA DI UN SENSORE AMPEROMETRICO PER APPLICAZIONI NEL SETTORE AGROALIMENTARE E BIOMEDICO

Laureando: *Davide Stival*

Relatore: *Ch.mo Prof. Alessandro Paccagnella*

Correlatore: *Dott. Alessandro De Toni*

13 Ottobre 2014

A.A. 2013/2014



*Alla mia famiglia*



# Indice

<b>Introduzione</b>	<b>13</b>
<b>1 Fondamenti di elettrochimica</b>	<b>15</b>
1.1 Potenziali di elettrodo . . . . .	15
1.2 Celle elettrochimiche . . . . .	18
1.2.1 Serie elettrochimica degli elementi . . . . .	19
1.2.2 Tensione di decomposizione elettrolitica e sovratensione . . . . .	22
1.2.3 Equazione di Butler-Volmer e reversibilità di un processo . . . . .	24
1.2.4 Celle a tre elettrodi . . . . .	26
1.2.5 Notazione convenzionale . . . . .	26
1.3 Elettrodi di riferimento . . . . .	27
1.3.1 Elettrodo di riferimento standard a idrogeno . . . . .	27
1.3.2 Elettrodo di riferimento in argento/argento cloruro . . . . .	27
1.3.3 Pseudo-riferimenti . . . . .	28
1.4 Cella elettrochimica DropSens DRP110 . . . . .	28
1.5 Trasporto di massa . . . . .	29
1.5.1 Diffusione . . . . .	29
1.5.2 Deriva . . . . .	30
1.5.3 Convezione . . . . .	30
1.5.4 Tecniche di controllo del trasporto . . . . .	31
<b>2 Tecniche di misura</b>	<b>35</b>
2.1 Ciclovoltammetria . . . . .	35
2.1.1 Concetti teorici e tecnica di misura . . . . .	35
2.1.2 Sistemi reversibili . . . . .	38
2.1.3 Sistemi irreversibili . . . . .	40
2.2 Spettroscopia d'impedenza elettrochimica . . . . .	41
2.2.1 Tecnica di misura . . . . .	41
2.3 Interfaccia soluzione-elettrodo . . . . .	43
2.3.1 Modello fisico . . . . .	43
2.3.2 Modello elettrico . . . . .	46
2.3.3 Fit circuitali . . . . .	51
<b>3 Banco di misura sperimentale</b>	<b>59</b>
3.1 Preparazione delle soluzioni . . . . .	59
3.1.1 Sostanze . . . . .	59
3.1.2 Solventi . . . . .	60
3.1.3 Pesate e diluizioni . . . . .	63
3.1.4 Lavaggio e asciugatura dei sensori . . . . .	64
3.2 Misure di ciclovoltammetria . . . . .	65
3.3 Misure di spettroscopia d'impedenza . . . . .	67

<b>4</b>	<b>Misure di caratterizzazione e modellizzazione elettrica</b>	<b>69</b>
4.1	Misure preliminari su matrice complessa . . . . .	70
4.1.1	Mancanza di assestamento della traccia ciclovoltammetrica . . . . .	72
4.1.2	Misure su soluzioni alternate a pari dispositivo . . . . .	76
4.2	Modellizzazione della deriva indotta da matrice complessa . . . . .	82
4.2.1	Analisi di misure su pura matrice complessa . . . . .	83
4.2.2	Analisi di misure su ferricianuro disciolto . . . . .	88
4.3	Misure di spettroscopia d'impedenza . . . . .	91
4.3.1	Misure senza mediatore . . . . .	95
4.3.2	Misure con mediatore . . . . .	96
<b>5</b>	<b>Misure di rilevazione diretta di molecola target</b>	<b>103</b>
5.1	Misure di riferimento . . . . .	106
5.2	Misure di molecola target in soluzione . . . . .	108
<b>6</b>	<b>Conclusioni</b>	<b>115</b>
<b>7</b>	<b>Prospettive</b>	<b>117</b>
	<b>Ringraziamenti</b>	<b>119</b>
<b>A</b>	<b>Definizioni e costanti fisiche</b>	<b>123</b>
A.1	Definizioni . . . . .	123
A.2	Tavola delle costanti fisiche . . . . .	130
<b>B</b>	<b>Derivazione matematica dell'elemento di Warburg</b>	<b>131</b>
<b>C</b>	<b>Codici Matlab</b>	<b>139</b>
C.1	Sequenziamento dei dati di ciclovoltammetria . . . . .	139
C.2	Tracce ciclovoltammetriche: tracciamento dinamico dei minimi locali . . .	140
	<b>Tavola degli acronimi</b>	<b>145</b>
	<b>Bibliografia</b>	<b>147</b>
	<b>Sitografia</b>	<b>149</b>

# Elenco delle figure

1.1	Problemi nella misura diretta di potenziale . . . . .	16
1.2	Riferimenti di tensione in presenza di un elettrodo di riferimento diverso dallo SHE . . . . .	18
1.3	Schema concettuale minimo della cella elettrochimica . . . . .	19
1.4	Pila Daniell . . . . .	20
1.5	Cella di elettrolisi del cloruro di sodio . . . . .	23
1.6	Reazioni reversibili e irreversibili, andamento qualitativo della relazione corrente-sovratensione . . . . .	25
1.7	Dispositivo DropSens DRP110 . . . . .	29
1.8	Linee di flusso laminare in un elettrodo a disco rotante . . . . .	31
1.9	Elettrodo a canale . . . . .	31
1.10	Profilo di diffusione di un reagente all'elettrodo . . . . .	33
1.11	Visione molecolare del profilo di diffusione di Figura 1.10 al tempo $t_1$ . . . . .	33
2.1	Ciclovoltammetria, segnale di potenziale in ingresso al sistema . . . . .	36
2.2	Ciclovoltammetria, andamento qualitativo della corrente misurata . . . . .	36
2.3	Estrazione della corrente di fondo dalla traccia ciclovoltammetrica . . . . .	39
2.4	Modello DL dell'interfaccia soluzione-elettrodo . . . . .	44
2.5	Modello di Graham dell'interfaccia soluzione-elettrodo . . . . .	45
2.6	Modello elettrico minimo dell'interfaccia soluzione-elettrodo . . . . .	47
2.7	Circuito equivalente di Randles . . . . .	48
2.8	Elemento CPE, simbolo circuitale . . . . .	50
2.9	Finestra del tool di fit circuitale integrato in ZView 2.80 . . . . .	52
2.10	Diagrammi di Bode e Nyquist della cella minima con resistenza di conduzione . . . . .	55
2.11	Diagrammi di Bode e Nyquist della cella minima con CPE e resistenza di conduzione . . . . .	56
2.12	Diagrammi di Bode e Nyquist della cella di Randles con elemento Warburg short . . . . .	57
3.1	Formula di struttura della molecola organica NADH . . . . .	60
3.2	Relazione colore-pH per il rosso fenolo . . . . .	62
3.3	Campioni di DMEM a differenti valori di pH . . . . .	62
3.4	Confezione di stoccaggio di DMEM e provette . . . . .	63
3.5	Pipettatrici manuali . . . . .	65
3.6	Spruzzetta da laboratorio . . . . .	66
3.7	Potenziostato CHI440A . . . . .	66
3.8	Interfaccia hardware DRP-DSC . . . . .	67
3.9	Tipologie di connettore in uso nel banco di misura ciclovoltammetrico . . . . .	67
3.10	Strumento Solartron 1260A . . . . .	68
4.1	Successione cronologica delle misure svolte . . . . .	71
4.2	Traccia ciclovoltammetrica con filtraggio a media mobile . . . . .	72

4.3	Ciclovoltammetria 5x15 su DMEM, selezione delle tracce misurate . . . . .	73
4.4	Ciclovoltammetria 5x15 su DMEM, minimi assoluti di corrente . . . . .	74
4.5	Ciclovoltammetria, 75 cicli su DMEM . . . . .	75
4.6	Ciclovoltammetria, 75 cicli su DMEM. Selezione delle tracce misurate . . .	75
4.7	Ciclovoltammetria su DMEM, minimi assoluti di corrente. Confronto tra test . . . . .	76
4.8	Ferricianuro 5 mM, ripetizioni in PBS . . . . .	77
4.9	Ferricianuro 5 mM, ripetizioni in DMEM . . . . .	78
4.10	Ferricianuro 5 mM diluito in PBS e DMEM, valori di corrente nel picco di ossidazione . . . . .	78
4.11	Ferricianuro 5 mM diluito in PBS e DMEM, tutte le ripetizioni . . . . .	81
4.12	Misure su DMEM puro per diversi valori di scan rate . . . . .	83
4.13	Sezione orizzontale di un insieme di tracce ciclovoltammetriche . . . . .	84
4.14	Ciclovoltammetria su DMEM, 75 cicli, DSC7. Particolare delle tracce ciclovoltammetriche . . . . .	85
4.15	Ciclovoltammetria su DMEM, 75 cicli. Dataset A: dati misurati . . . . .	85
4.16	Ciclovoltammetria su DMEM, 75 cicli. Dataset A: dati misurati e fit secondo Langmuir . . . . .	87
4.17	Ciclovoltammetria su DMEM, 75 cicli. Dataset B: dati misurati e fit secondo Langmuir . . . . .	87
4.18	Ciclovoltammetria su DMEM, 75 cicli. Dataset C: dati misurati e fit secondo Langmuir . . . . .	88
4.19	Ferricianuro 5 mM diluito in miscele di PBS e DMEM, tutti i cicli . . . . .	89
4.20	Ferricianuro 5 mM diluito in miscele di PBS e DMEM, valori medi con varianza su un sottinsieme dei cicli . . . . .	90
4.21	Ferricianuro 5 mM diluito in miscele di PBS e DMEM, interpolazione dei valori di potenziale in corrispondenza dei picchi di ossidazione . . . . .	91
4.22	Determinazione del potenziale redox del mediatore impiegato nelle misure di spettroscopia d'impedenza . . . . .	92
4.23	Misure standard precedenti la ciclovoltammetria, campione senza mediato- re. Mappa di selezione dei dispositivi . . . . .	94
4.24	Misure senza mediatore, diagramma di Bode . . . . .	95
4.25	Modello circuitale equivalente della cella elettrochimica nelle misure spet- troscopiche senza mediatore . . . . .	96
4.26	Misure con mediatore, diagramma di Bode . . . . .	97
4.27	Modello circuitale equivalente della cella elettrochimica nelle misure spet- troscopiche con mediatore . . . . .	98
4.28	Misura estesa 2 con mediatore, pre-ciclovoltammetria. Diagramma di Nyquist	99
4.29	Modello circuitale equivalente della cella elettrochimica nella misura spet- troscopica post-DMEM con mediatore . . . . .	100
4.30	Modifiche superficiali indotte da DMEM: un indizio empirico . . . . .	101
5.1	Picchi di corrente, segnale somma . . . . .	105
5.2	Misure di riferimento per la curva di calibrazione del sensore . . . . .	107
5.3	Misure di rilevazione di NADH in DMEM . . . . .	109
5.4	Misure di rilevazione di NADH in PBS . . . . .	110
5.5	Misure di rilevazione di NADH in HBRS . . . . .	111
5.6	NADH in DMEM, valori di picco . . . . .	112
5.7	NADH in PBS, valori di picco . . . . .	113
5.8	NADH in HBRS, valori di picco . . . . .	113



5.9	NADH in PBS e HBRS, valori di picco estratti dopo sottrazione dei valori di riferimento . . . . .	114
A.1	Strato di diffusione di Nernst e spessore di Nernst . . . . .	129
B.1	Elemento di Warburg per mezzo semi-infinito, impedenza normalizzata alle costanti; diagrammi di Bode e Nyquist . . . . .	135
B.2	Elemento Warburg short, impedenza normalizzata alle costanti; diagrammi di Bode e Nyquist . . . . .	137
B.3	Elemento Warburg open, impedenza normalizzata alle costanti; diagrammi di Bode e Nyquist . . . . .	138
C.1	Esempio di esecuzione dell'algoritmo <i>movingmin</i> . . . . .	143



# Elenco delle tabelle

2.1	Equivalenze tra parametri ZView e teorici, elemento Warburg short . . . . .	53
2.2	Equivalenze tra parametri ZView e teorici, elemento Warburg open . . . . .	53
2.3	Equivalenze tra parametri ZView e teorici, elemento CPE . . . . .	54
3.1	Composizione chimica del buffer PBS 1x . . . . .	61
3.2	Composizione chimica del liquido di coltura cellulare DMEM . . . . .	61
3.3	Composizione chimica del buffer HBRS . . . . .	62
4.1	Test su puro DMEM, 75 cicli, protocollo A. Interpolazione con legge di Langmuir: valore dei parametri . . . . .	86
4.2	Ferricianuro 5 mM diluito in miscele di PBS e DMEM. Interpolazione con legge di Langmuir: valore dei parametri . . . . .	91
4.3	Misure estese senza mediatore, valori di convergenza del fit circuitale . . . . .	97
4.4	Misura estesa 2 con mediatore, valori di convergenza del fit circuitale . . . . .	98
4.5	Misura estesa 3 post-PBS con mediatore, valori di convergenza del fit circuitale . . . . .	100
4.6	Misura estesa 3 post-HBRS con mediatore, valori di convergenza del fit circuitale . . . . .	100
4.7	Misura estesa 3 post-DMEM con mediatore, valori di convergenza del fit circuitale . . . . .	101
A.1	Sigle impiegate nelle equazioni chimiche in associazione allo stato di reagenti o prodotti. . . . .	128
A.2	Costanti fisiche . . . . .	130



# Introduzione

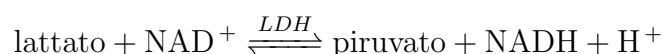
Le misure e i risultati introdotti nella presente Tesi si inseriscono in un più ampio progetto, denominato MyoScreen, finanziato dalla Regione Veneto (DGR n. 1604 del 31/07/2012) e sviluppato dall'Università di Padova in collaborazione con lo spin-off universitario Next Step Engineering. Ci proponiamo qui di inquadrare il progetto, collocare al suo interno la nostra attività di Tesi e descrivere come tale attività verrà presentata nelle prossime pagine.

Il progetto MyoScreen si propone di realizzare un sensore per la rilevazione precoce di doping anabolizzante nel bestiame d'allevamento, una pratica illegale messa in atto per aumentare il volume di carne prodotta. La logica alla base del sensore è semplice ma intelligente: le sostanze anabolizzanti sono molte (nel progetto vengono testati clenbuterolo, somatomedina C e cortisolo) ma i target su cui agiscono a livello genetico sono perlopiù gli stessi. Attraverso tecniche di ingegneria genetica è possibile rimpiazzare questi geni con altri preposti alla produzione di molecole diverse: nel nostro caso si tratta di acido lattico  $C_2H_4OHCOOH$ , che in soluzione diventa lo ione lattato  $C_2H_3OCOO^-$ .

Il risultato si riassume nella seguente catena:

- un campione biologico (sangue, urina) viene prelevato da un animale; qualora siano stati effettuati trattamenti anabolizzanti il campione conterrà anche la sostanza dopante;
- il campione viene esposto a una coltura cellulare contenente cellule muscolari ingegnerizzate geneticamente per esprimere acido lattico in presenza di anabolizzanti. Questa sostanza viene espulsa esternamente alla membrana cellulare e pertanto si troverà disciolta nel liquido di coltura;
- la rilevazione di lattato da un campione del liquido di coltura consente di dedurre la presenza di dopante.

La rilevazione di lattato può essere fatta secondo procedure diverse. I titolari del progetto hanno deciso di seguire una catena di trasduzione chimica che nella versione più semplice consta di un solo passaggio (versioni più complesse sono al vaglio del gruppo di ricerca): attraverso una reazione enzimatica convertire la presenza di lattato in soluzione nella presenza di una seconda molecola, e rilevare poi quest'ultima attraverso un sensore elettrochimico. Per sensore elettrochimico si intende un sistema costituito da almeno una cella elettrochimica e capace di trasdurre un segnale di natura chimica (anche la semplice presenza di una sostanza in soluzione) in uno di natura elettrica; questi argomenti saranno ripreso con maggiore dettaglio. La reazione chimica di nostro interesse è la seguente:



dove il piruvato deriva dall'ossidazione del lattato e ha formula  $C_2H_3OCOO^-$ , mentre  $\text{NAD}^+$  e  $\text{NADH}$  sono le forme rispettivamente ossidata e ridotta della molecola nicotinammide adenina dinucleotide la cui formula di struttura è riportata in Figura 3.1. LDH

è la sigla che contraddistingue l'enzima lattato deidrogenasi (*lactate dehydrogenase* in letteratura) che catalizza il processo. La direzione della reazione (da sinistra verso destra o viceversa) dipende dal pH della soluzione, un argomento non trattato nella presente Tesi. Il nostro lavoro di Tesi si propone di studiare la capacità del sensore di rilevare la presenza di NADH in soluzione. Quest'ultima, per come è stato presentato fin qui il progetto, comprende il liquido di coltura biologico DMEM (Dulbecco's modified medium Eagle), il campione biologico con eventualmente il dopante, l'enzima LDH e il reagente di catalisi  $\text{NAD}^+$ . Possono essere compresenti antimicotici, antibiotici e siero fetale bovino per il nutrimento delle cellule. Verrà illustrato nel testo che sono possibili operazioni semplificative le quali escludono parte di questi componenti dal campione di misura; ai fini della nostra Tesi ci siamo concentrati sulla rilevazione di NADH in DMEM e successivamente, per motivi che verranno spiegati, in un liquido di mantenimento cellulare detto HBRS (HEPES buffered Ringer solution).

Riteniamo importante sottolineare che il sensore fa uso della catalisi enzimatica solo come di un mezzo per la rilevazione del lattato: se volessimo usare un approccio a scatola chiusa (*black box*) dovremmo dire che stiamo trattando un sensore di lattato e non di NADH, essendo il lattato la sostanza data in ingresso al nostro sistema.

Va inoltre detto che il lavoro da noi svolto si ricollega al progetto MyoScreen solo per il fatto che il lattato rilevato attraverso la misura di NADH è sintetizzato in risposta alla presenza di dopante nel campione biologico. Le soluzioni fisiologiche e di coltura cellulare impiegate tuttavia sono non specifiche: il sensore può essere utilizzato per rilevare lattato qualunque sia la provenienza, anche umana, del campione biologico contenente dopante. Infine non è escluso che si possa fare uso del sensore per rilevare lattato anche in altri contesti, ad esempio in un campione di sangue; in questo scenario si rende superfluo lo stadio di trasduzione ad opera delle cellule ingegnerizzate (il lattato è già presente e non va sintetizzato). Una misura di questo tipo può essere impiegata nella diagnosi dell'acidosi del flusso ematico, una condizione patologica spesso grave definita da un accumulo di lattato nel sangue.

Presentiamo ora la struttura della Tesi.

I capitoli 1 e 2 affrontano lo studio del sensore: il primo introducendo i concetti di elettrochimica necessari a comprenderne il funzionamento, quindi il processo di trasduzione del segnale da chimico ad elettrico; il secondo approfondendo le tecniche di misura che facendo uso del sensore consentono di estrarre informazioni sul sistema elettrochimico in esame. Un approfondimento su queste tematiche, più corposo sotto il profilo matematico, viene riportato in Appendice B.

Il Capitolo 3 descrive il banco di misura impiegato per realizzare i test presentati nei successivi capitoli 4 e 5. Il Capitolo 4 introduce risultati di rilievo per la pianificazione del progetto MyoScreen, in quanto si conclude sconsigliando l'uso di DMEM come solvente durante le misure su NADH (pur mantenendolo come liquido di coltura cellulare) e suggerendo al suo posto il tampone HBRS. Il Capitolo 5 mostra le curve di calibrazione del sensore per la rilevazione di NADH in HBRS.

In coda al testo sono state aggiunte altre due Appendici oltre a quella già citata: l'Appendice A presenta le definizioni dei termini meno familiari a uno studente proveniente da un percorso di studi in Ingegneria Elettronica, insieme alla definizione delle costanti numeriche impiegate; in Appendice C vengono riportati alcuni semplici algoritmi realizzati in Matlab per la gestione del grande flusso di dati numerici che ha costituito una parte consistente del nostro lavoro al di fuori del laboratorio.

Le ultime pagine riportano la tavola degli acronimi impiegati nella presente Tesi e i necessari riferimenti bibliografici.

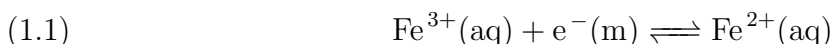
# Capitolo 1

## Fondamenti di elettrochimica

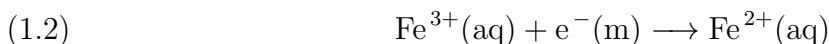
### 1.1 Potenziali di elettrodo

Definiamo un elettrodo come un corpo metallico o semiconduttore impiegato per stabilire un contatto elettrico con una porzione non metallica di un circuito, costituita nel nostro caso da una soluzione elettrolitica. Ignoriamo per il momento il modo in cui il circuito viene realizzato (questo argomento viene trattato in sezione 1.2).

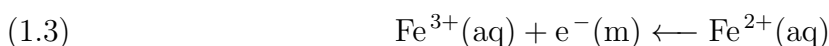
Un processo elettrodico è descrivibile col trasferimento di carica (reazione redox) attraverso la superficie di separazione tra l'elettrodo  $M_W$ , che supporremo metallico per semplicità, e la soluzione in cui esso è immerso. Una tipica reazione potrebbe essere:



in cui la doppia freccia indica che il processo di ossidazione dell'elettrodo:



è in equilibrio dinamico con il processo opposto di ossidazione del ferro disciolto in soluzione:



La soluzione agisce quindi da sorgente o da pozzo di elettroni a seconda della direzione della reazione. All'equilibrio si viene a creare una differenza di potenziale tra elettrodo e soluzione, argomento ripreso con più dettaglio nel Capitolo 2.3. Indicando con  $\phi_m$  e  $\phi_s$  il potenziale rispettivamente dell'elettrodo  $M_W$  e della soluzione e con ESI (Electrode-Solution Interface) la superficie di separazione tra i due, la differenza di potenziale alla ESI può essere espressa come:

$$(1.4) \quad \Delta\phi_{ms,Mw} = \phi_m - \phi_s$$

Sebbene il valore di  $\Delta\phi_{ms,Mw}$  sia ben definito per ogni coppia soluzione-elettrodo, una misura diretta di questo valore presenta una difficoltà intrinseca dovuta al fatto che qualsiasi apparato di misura  $M_{mis}$  inserito in soluzione presenterà esso stesso una propria caduta di potenziale con la soluzione. La lettura del voltmetro quindi fornirà non la caduta di potenziale  $\Delta\phi_{ms,Mw}$  tra  $M_W$  e soluzione bensì, assumendo equipotenziali i punti A e B (Figura 1.1), la caduta di potenziale complessiva  $E$  ai due elettrodi:

$$(1.5) \quad E = \Delta\phi_{ms,Mw} - \Delta\phi_{ms,Mmis}$$

Per ovviare a questo problema è possibile seguire lo stesso approccio già incontrato nei

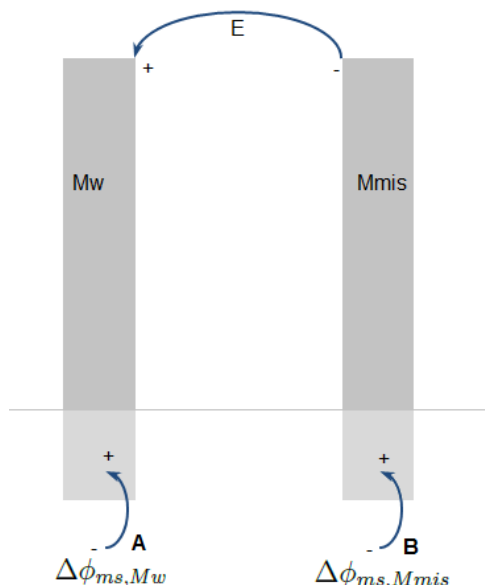


Figura 1.1: Problemi nella misura diretta di potenziale.

corsi di fisica (e di riflesso in quelli di elettronica), ovvero definire un elemento a potenziale nullo e riferire ad esso ogni altro potenziale. Andiamo per gradi. Definiamo innanzitutto il concetto di elettrodo di riferimento, ovvero un elettrodo  $M_{ref}$  tale da garantire un valore di  $\Delta\phi_{ms,Mref}$  costante e stabile nel tempo. In corrispondenza l'equazione (1.5) diventa

$$(1.6) \quad E \stackrel{1.5}{=} \Delta\phi_{ms,Mw} - \Delta\phi_{ms,Mref} = \Delta\phi_{ms,Mw} - const$$

Tra gli elettrodi di riferimento esistenti ne è stato scelto uno, l'elettrodo standard a idrogeno (SHE, Standard Hydrogen Electrode) descritto in sezione 1.3.1, per il quale si è definito  $\Delta\phi_{ms,SHE} = const = 0$ ; esso costituisce il riferimento zero di potenziale e in corrispondenza la (1.6) diventa:

$$(1.7) \quad E \stackrel{1.6}{=} \Delta\phi_{ms,Mw} - \Delta\phi_{ms,SHE} = \Delta\phi_{ms,Mw}$$

Questo potenziale, espresso in Volt e calcolato rispetto allo SHE, prende il nome di *potenziale di elettrodo* o *potenziale redox*. A scanso di errori è bene evidenziare che questo concetto è definito solo per un elettrodo all'equilibrio, cioè attraverso il quale non scorra corrente da o verso il circuito elettrico esterno, e inserito in una cella elettrochimica con l'elettrodo SHE (questo argomento sarà ripreso nel dettaglio in sezione 1.2).

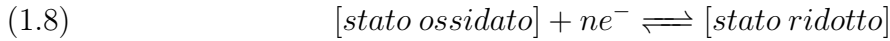
Qualora la misura venga effettuata con  $M_w$  in condizioni standard:

- reagenti e prodotti in concentrazione 1M (1-molare) con attività unitaria;
- $T=25^\circ\text{C}$ ;
- liquidi e solidi allo stato puro;
- gas alla pressione parziale di 100kPa (1atm);

si parla di *potenziale redox standard* lo si indica come  $E^0$  o  $E^\phi$ . I valori di  $E^\phi$  si trovano tabulati in letteratura.



Per elettrodi in condizioni non standard interessati dalla reazione redox in equilibrio:



è possibile calcolare il valore del potenziale redox noto  $E^\phi$  attraverso l'equazione di Nernst:

$$(1.9) \quad E = E^\phi + \frac{RT}{nF} \ln \left[ \frac{\prod_i (a_{i,ox}^{v_{i,ox}})}{\prod_j (a_{j,red}^{v_{j,red}})} \right]$$

dove  $R$  la costante universale dei gas,  $n$  il numero di elettroni trasferiti,  $F$  la costante di Faraday,  $v_{red}$  e  $v_{ox}$  i coefficienti stechiometrici in modulo delle specie ridotte e ossidate;  $a_{red}$  e  $a_{ox}$  invece vanno presi uguali a:

- i valori di attività, per specie in soluzione;
- i valori di fugacità, per gas;
- l'unità, qualora si tratti del solvente oppure di composti solidi o liquidi puri.

Ricordando la regola di cambio di base per i logaritmi ( $\log_a b = \log_n b / \log_n a$ ) la (1.9) può essere riscritta come:

$$(1.10) \quad E \stackrel{1.9}{=} E^\phi + \frac{RT}{nF \log(e)} \log \left[ \frac{\prod_i (a_{i,ox}^{v_{i,ox}})}{\prod_j (a_{j,red}^{v_{j,red}})} \right]$$

dove  $e$  è il Numero di Nepero. Per  $T=25^\circ\text{C}$  si ha  $\frac{RT}{F \log(e)} = 0.0592$ .

Si segnala che stanti le relazioni:

$$(1.11) \quad \begin{cases} R = N_A k_B \\ F = N_A q \end{cases}$$

dove  $N_A$  è il Numero di Avogadro e  $q$  il quanto elementare di carica, il rapporto  $\frac{RT}{nF}$  di equazioni (1.9) e (1.10) può anche essere trovato in letteratura come  $\frac{k_B T}{nq}$ .

Giunti a questo punto il problema posto a inizio Capitolo ha trovato soluzione. L'elettrodo SHE fa da riferimento di tensione, l'analogo del nodo di massa nei circuiti elettronici. Ogni altro potenziale è riferito a questa "massa".

Nella pratica di laboratorio è possibile utilizzare uno qualsiasi degli elettrodi di riferimento esistenti, avendo cura di non trascurare il contributo di potenziale dell'elettrodo di riferimento rispetto all'elettrodo SHE. Detto altrimenti, con riferimento alla Figura 1.2, siamo interessati a conoscere il potenziale  $E$  il cui valore (supponendo equipotenziale ogni punto in soluzione) secondo la relazione (1.7) è:

$$(1.12) \quad E = \Delta\phi_{ms,Mw} - \Delta\phi_{ms,SHE} = \Delta\phi_{ms,Mw}$$

Volendo impiegare un elettrodo di riferimento al posto dello SHE, si osserva che:

$$(1.13) \quad E = E_1 + E_2 = (\Delta\phi_{ms,Mw} - \Delta\phi_{ms,Mref}) + (\Delta\phi_{ms,Mref} - \Delta\phi_{ms,SHE})$$

e dunque al valore  $E_1$  fornito dalla lettura del voltmetro va sommato il potenziale redox  $E_2$  dell'elettrodo di riferimento. Si faccia attenzione che l'immagine vuole solo rappresentare lo schema di calcolo delle tensioni e non va presa come esempio di una reale configurazione di elettrodi: in particolare, la soluzione in cui gli elettrodi sono immersi tipicamente non è la stessa per ciascuno, dal momento che ogni potenziale redox è definito non per l'elettrodo

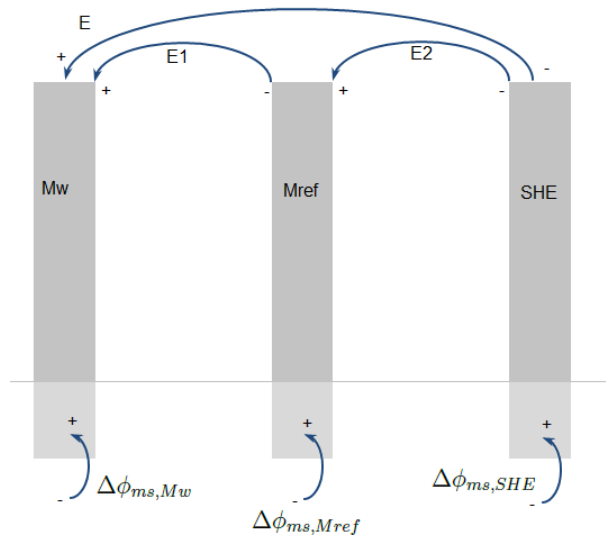


Figura 1.2: Riferimenti di tensione in presenza di un elettrodo di riferimento diverso dallo SHE.

in sè bensì per la coppia soluzione-elettrodo tra i quali si sviluppa la reazione redox, e quindi ogni elettrodo si accompagna a una specifica soluzione.

Segnaliamo per completezza l'esistenza dei cosiddetti elettrodi di pseudo-riferimento, il cui potenziale redox non è costante ma è comunque calcolabile a priori non appena siano definite le condizioni operative; stabilite queste l'elettrodo di pseudo-riferimento garantisce un valore stabile di potenziale redox, anche per condizioni di lavoro per le quali i comuni elettrodi di riferimento smettono di funzionare.

## 1.2 Celle elettrochimiche

I concetti esposti in questa sezione sono finalizzati alla comprensione dei concetti di *serie elettrochimica* e *sovratensione*.

Una cella elettrochimica (Figura 1.3) è formata da due elettrodi, immersi ciascuno in una soluzione ben definita con la quale realizzano una reazione redox e il tutto collegato in modo da formare un circuito elettrico chiuso. Questo è realizzato contattando i due elettrodi con opportuni conduttori (anche un semplice filo metallico) e contattando le due soluzioni con una membrana porosa o un ponte salino, il cui funzionamento sarà descritto nel seguito. L'insieme di un elettrodo e della rispettiva soluzione viene anche detto *semi-cella* o *semi-elemento* oppure (con abuso di termini) *elettrodo*. Con questa breve introduzione abbiamo peraltro ripreso un concetto importante, già anticipato nella precedente sezione: ogni semi-cella è definita da una specifica coppia soluzione-elettrodo tra i quali intercorre una specifica reazione redox; ne consegue che gli elettrodi di ogni semi-cella saranno tipicamente immersi in soluzioni diverse.

La conduzione elettrica avviene con modalità differenti nelle diverse parti componenti il circuito:

- nel bulk dell'elettrodo e nei cavi di interconnessione tra elettrodi la conduzione avviene per moto di elettroni in banda di conduzione (o anche di lacune in banda di valenza, nel caso di elettrodi in semiconduttore), fenomeno che si assume ben noto al lettore proveniente da un corso di sudi in Ingegneria Elettronica;
- all'interno della soluzione elettrolitica il trasporto di carica è affidato al moto di particelle cariche (ioni) anziché di elettroni;

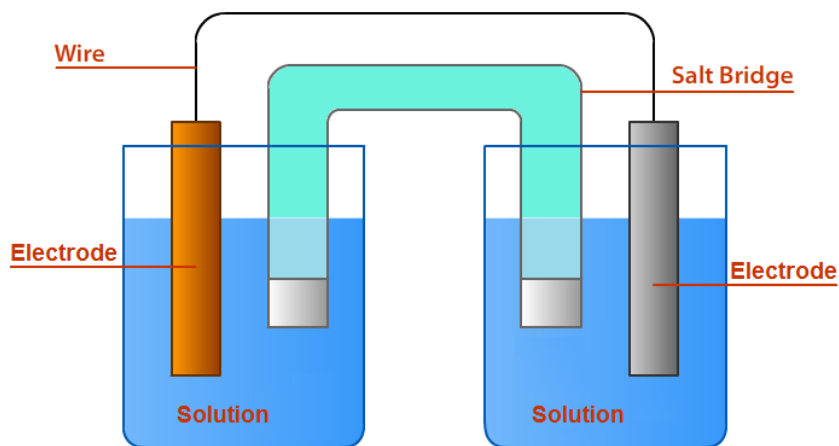


Figura 1.3: Schema concettuale minimo della cella elettrochimica [fonte: chemwiki.ucdavis.edu].

- tra soluzioni la conduzione è affidata all'intervento del ponte salino, costituito da un serbatoio chiuso da setti porosi e contenente sale disciolto i cui ioni non prendono parte al processo di ossidoriduzione. La dimensione dei pori dei setti è tale da renderli sufficientemente permeabili da consentire la migrazione di ioni dal ponte verso le soluzioni, ma non abbastanza da permettere che le soluzioni entrino in contatto tra loro attraverso il ponte (se non in tempi molto lunghi). Questo è desiderabile poichè un rimescolamento diretto delle due soluzioni potrebbe alterare le condizioni operative della cella. Qualora questa eventualità non costituisca un problema è possibile impiegare al posto dell'intero ponte salino una membrana porosa, che consenta il transito diretto di ioni tra le due soluzioni, oppure immergere direttamente i due elettrodi nella stessa soluzione;
- all'interfaccia soluzione-elettrodo si verificano processi faradici, nei quali la carica viene trasferita tra soluzione ed elettrodo attraverso la superficie di quest'ultimo grazie a reazioni di ossidoriduzione. La reazione redox complessiva è suddivisa tra i due elettrodi, fisicamente separati, e solo il conduttore che li collega consente agli elettroni liberati nel processo di ossidazione di spostarsi e raggiungere l'elettrodo dove avviene la reazione di riduzione; si dice in questo caso che la reazione redox avviene *per via elettrochimica*.

Le celle elettrochimiche si dividono in due importanti categorie:

- celle galvaniche (pile), in cui si verifica una conversione spontanea di energia da chimica ad elettrica, fenomeno che le rende impiegabili come generatori elettrici. In questo ambito le semi-celle vengono anche chiamate *semi-elementi galvanici* o *semi-pile*;
- celle elettrolitiche, nelle quali avviene una conversione di energia da elettrica a chimica. Il processo, detto di *elettrolisi*, non è spontaneo e viene indotto dall'applicazione di un potenziale esterno.

### 1.2.1 Serie elettrochimica degli elementi

In questa sezione descriveremo il funzionamento di una classica cella galvanica, la pila Daniell, per introdurre concetti di ampio uso nell'ambito delle celle elettrochimiche. Consideriamo la cella elettrochimica di Figura 1.4. La semi-pila di sinistra è costituita

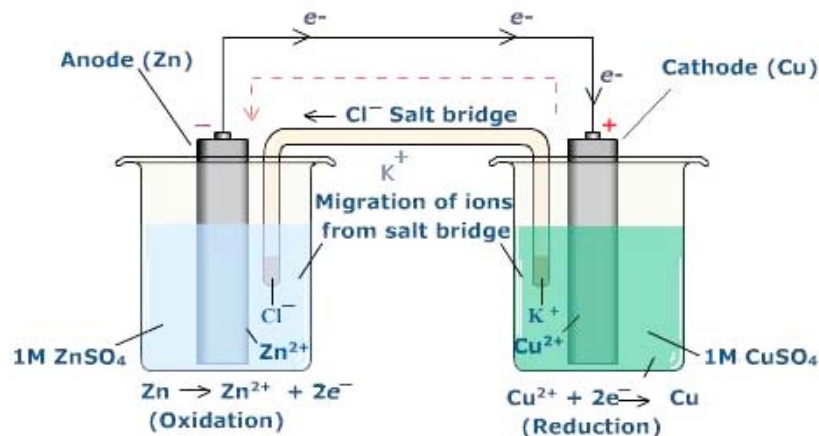


Figura 1.4: Pila Daniell [fonte: chem-guide.blogspot.com].

da un elettrodo in zinco (Zn) immerso in una soluzione 1M di solfato di zinco ( $\text{ZnSO}_4$ ) dissociato in ioni  $\text{Zn}^{2+}$  e  $\text{SO}_4^{2-}$ . La semi-pila di destra è formata da un elettrodo in rame (Cu) immerso in una soluzione 1M di solfato di rame(II) ( $\text{CuSO}_4$ ) dissociato in ioni  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{SO}_4^{2-}$ . La reazione redox che interessa la pila si può spezzare nelle due (semi)reazioni rispettivamente di ossidazione e di riduzione:



le quali avvengono separatamente alla semi-pila di sinistra e a quella di destra. L'elettrodo di zinco, interessato dalla (semi)reazione di ossidazione, viene definito *anodo*; quello di rame, interessato dalla (semi)reazione di riduzione, viene definito *catodo*.

Complessivamente lo zinco dell'elettrodo si distacca, sciogliendosi in soluzione e liberando due elettroni; questi viaggiano verso la semi-cella di destra dove provvedono a ridurre ioni  $\text{Cu}^{2+}$  che dalla soluzione si depositano sull'elettrodo in rame. L'elettroneutralità della soluzione verrà poi ripristinata richiamando ioni dal ponte salino (se questo processo non venisse reso possibile si creerebbe un accumulo di carica non bilanciata che ostacolerebbe ogni ulteriore spostamento di elettroni dall'anodo al catodo).

Cerchiamo ora di capire la dinamica del processo descritto. Un metallo M inserito in una soluzione di un suo sale instaura con essa una reazione redox del tipo:



Nella reazione diretta ioni disciolti si riducono prelevando elettroni dal metallo M dell'elettrodo; in quella inversa il metallo M dell'elettrodo si ossida e passa in soluzione come ione  $\text{M}^{n+}$ , lasciando sull'elettrodo  $n$  elettroni. Ne consegue che se la reazione diretta domina su quella inversa l'elettrodo si carica positivamente, viceversa se la reazione inversa domina su quella diretta l'elettrodo si carica negativamente. Da questo si può anche dedurre che l'anodo sarà carico negativamente e il catodo positivamente. Nel caso della pila Daniell, per i motivi esposti nella prossima sottosezione, il rame ha una minore tendenza alla ossidazione (reazione  $\text{Cu(s)} \longrightarrow \text{Cu}^{2+}(\text{aq}) + 2\text{e}^{-}$ ) dello zinco (reazione (1.14)) e dunque l'elettrodo in rame acquisirà una carica negativa minore dell'elettrodo di zinco. Questo si traduce nel moto di elettroni dallo zinco al rame.

Ora, la presenza di cariche in moto è associabile ad un potenziale elettrico. Definiamo in-

nanzitutto la *forza elettromotrice f.e.m.* della pila o *potenziale di cella* come la differenza dei potenziali redox di catodo (polo positivo) e anodo (polo negativo):

$$(1.17) \quad f.e.m. = E_{catodo} - E_{anodo} > 0$$

calcolabili ciascuno separatamente attraverso l'equazione di Nernst (1.9) o (1.10). Qualora anodo e catodo siano in condizioni standard la *f.e.m.* può trovarsi indicata col simbolo  $E_{cell}^0$  o  $E_{cell}^\phi$ . In regime di conduzione di corrente dunque la differenza di potenziale tra i due elettrodi è data da:

$$(1.18) \quad f.e.m. - Ri = E_{catodo} - E_{anodo} - Ri$$

dove  $R$  è la resistenza del percorso conduttivo tra i due elettrodi,  $i$  la corrente che vi circola e  $Ri$  tiene conto (legge di Ohm) della caduta di potenziale lungo tale percorso. La resistenza  $R$  costituisce la resistenza di sorgente nel modello elettrico della pila. Dalla (1.18) si ricava peraltro che la *f.e.m.* rappresenta la massima differenza di potenziale che si può instaurare tra i due elettrodi, quella per corrente nulla.

Giunti a questo punto della trattazione siamo in grado di riprendere con più criterio il concetto di potenziale redox esposto in sezione 1.1 e rivederlo alla luce del concetto di potenziale di cella.

Qualora sia necessario effettuare una misura di potenziale redox si utilizza una cella elettrochimica, configurata utilizzando uno SHE come prima semi-cella, l'elettrodo sotto esame come seconda semi-cella, e collegando i due elettrodi in serie con un voltmetro. Dal momento che il voltmetro ha un alto valore di resistenza serie (idealmente infinito) ciò garantisce che tra gli elettrodi scorra una corrente trascurabile (idealmente nulla), così come richiesto in sezione 1.1 per la definizione di potenziale redox. In questa condizione (condizione di equilibrio) l'elettrodo sotto esame è interessato da una reazione redox in equilibrio dinamico. Ad esempio l'elettrodo in zinco che nella pila Daniell costituisce l'anodo sarebbe interessato dalla reazione redox  $Zn \rightleftharpoons Zn^{2+} + 2e^-$  e non da una reazione di sola ossidazione come invece succede nella pila Daniell.

A questo punto sorge il problema, in assenza di corrente, di identificare il ruolo dello zinco (anodo o catodo) rispetto allo SHE; questa distinzione è necessaria alla corretta applicazione della definizione (1.17). Il problema viene risolto inserendo un (altro) elettrodo di zinco direttamente in una soluzione di ioni  $H_3O^+$ , ovvero la stessa soluzione impiegata nello SHE (si veda al proposito la sezione 1.3.1) così da verificare il decorso della reazione redox senza l'intermediazione di contatti elettrici e ponti salini. In questo caso il processo redox libera idrogeno gassoso, indice che la stessa reazione in una cella elettrochimica determinerebbe la riduzione dello ione idrossonio  $H_3O^+$  e quindi l'ossidazione dello zinco. Lo zinco fa dunque da anodo in cella con lo SHE.

A questo punto l'applicazione della (1.17) ci permette di determinare che per questa cella si ha:

$$(1.19) \quad f.e.m. = E_{catodo} - E_{anodo} = 0 - E_{anodo} = -E_{anodo} < 0$$

Poichè la lettura del voltmetro in condizioni standard fornisce il valore  $f.e.m. = 760mV$  se ne ricava che il potenziale redox standard dello zinco è di  $-760mV$ .

Qualora un elettrodo si comporti invece da catodo accoppiato allo SHE la (1.17) diventa:

$$(1.20) \quad f.e.m. = E_{catodo} - E_{anodo} = E_{catodo} - 0 = E_{catodo} > 0$$

Il rame ad esempio si comporta da catodo rispetto allo SHE e ha potenziale redox standard pari a 0.34V.

Il segno del potenziale redox porta dunque con sé una informazione preziosa: se positivo indica che l'elettrodo si comporta da catodo nei confronti dello SHE; se negativo, che si comporta da anodo. Per questo motivo il potenziale redox prende anche il nome di *potenziale di riduzione* nel primo caso e (invertendone il segno) di *potenziale di ossidazione* nel secondo, anche se è abitudine esprimersi in termini del solo potenziale di riduzione.

È possibile a questo punto ordinare gli elettrodi per valori decrescenti del potenziale di riduzione in quella che prende il nome di *serie elettrochimica degli elementi*. Presi due elettrodi della serie in condizioni standard, quello con valore maggiore del potenziale redox tenderà a ossidare quello con potenziale minore e dunque costituirebbe il catodo in una ipotetica cella galvanica che avesse loro due come semi-elementi. Detto altrimenti, elementi più in alto nella serie hanno potere ossidante maggiore; questo giustifica l'affermazione fatta nella precedente sottosezione che il rame ha una minore tendenza alla ossidazione (maggiore tendenza alla riduzione) dello zinco. Un altro modo di vedere lo stesso concetto è affermare che la reazione di ossidazione dello zinco ad opera del rame è un processo spontaneo mentre il processo contrario non lo è; ovviamente la spontaneità di una reazione non implica per forza un alto tasso di reazione, così che un processo potrebbe essere spontaneo ma estremamente lento.

Si faccia attenzione che se un elettrodo ha potenziale redox maggiore di un altro in condizioni standard, questo non implica (effetto dell'equazione di Nernst (1.9)) che fuori dalle condizioni standard non possa succedere l'opposto.

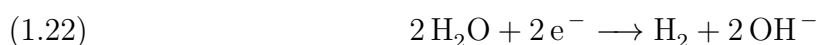
### 1.2.2 Tensione di decomposizione elettrolitica e sovratensione

Per introdurre il concetto di sovratensione ci appoggiamo a un esempio basilare, il processo di elettrolisi del cloruro di sodio NaCl in soluzione acquosa. Il fenomeno dell'elettrolisi consiste nell'apporto di energia elettrica ad un sistema chimico allo scopo di indurre una reazione redox non spontanea. Strutturalmente una cella elettrolitica è composta da due elettrodi (ad esempio in platino) collegati a un generatore di tensione continua e immersi nella stessa soluzione; quest'ultimo punto implica che, a differenza delle celle galvaniche, è tipicamente assente il ponte salino. Può tuttavia essere presente un setto poroso per evitare che i prodotti della reazione di elettrolisi interagiscano tra loro dando luogo a reazioni non volute.

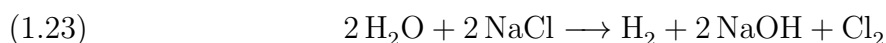
Con riferimento alla Figura 1.5, consideriamo una cella formata da due elettrodi inseriti in una soluzione contenente cloruro di sodio disciolto, quindi dissociato in ioni  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$ . I due elettrodi sono polarizzati dalla pila e ciò determina l'instaurarsi in soluzione di un campo elettrico  $\xi$  (in verde in Figura) e quindi la migrazione per deriva degli ioni; in accordo al verso del vettore campo elettrico lo ione  $\text{Na}^+$  si sposta verso l'elettrodo di destra polarizzato negativamente, mentre lo ione  $\text{Cl}^-$  si muove verso quello di sinistra polarizzato positivamente. La reazione che complessivamente interessa la cella coinvolge anche lo ione ossidrilico  $\text{OH}^-$  presente in soluzione per il naturale processo di dissociazione dell'acqua; divisa nelle due semi-reazioni, si ha l'ossidazione in due passi del cloro:



all'elettrodo positivo e la riduzione dell'acqua:



all'elettrodo negativo. La somma delle due semi-reazioni, comprensiva della presenza del sodio (non reagente) fornisce l'equazione chimica



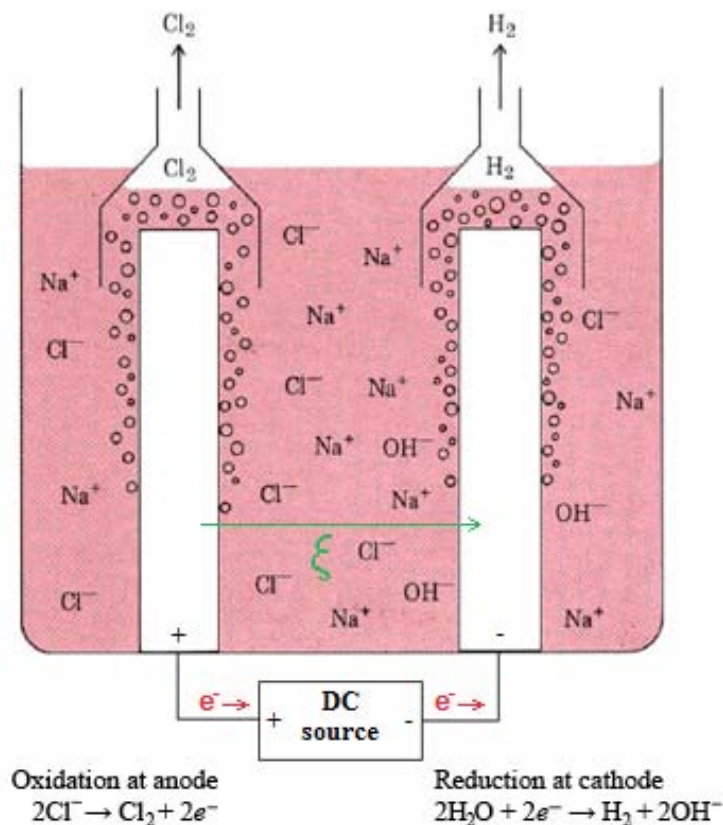


Figura 1.5: Cella di elettrolisi del cloruro di sodio. In verde il campo elettrico che si instaura tra i due elettrodi. Le cappe sopra agli elettrodi raccolgono i prodotti gassosi di reazione [fonte: <http://www.chimicamo.org/>].

della reazione redox che complessivamente interessa la cella. Va osservato che stante la presenza dell'acqua come reagente erano possibili anche altre semi-reazioni, tuttavia sfavorite rispetto alle (1.21) e (1.22) in quanto richiedevano un maggiore apporto di energia dall'esterno. Ad esempio la reazione di riduzione dell'acqua è favorita rispetto a quella del sodio ( $\text{Na}^+ + e^- \rightarrow \text{Na}$ ), pure possibile, perché l'acqua ha già rispetto al sodio una maggiore tendenza a ridursi cioè un potenziale di riduzione maggiore. Diventa quindi rilevante anche per le celle elettrolitiche l'impiego della serie elettrochimica degli elementi. Si osservi che in una cella elettrolitica la (semi)reazione di ossidazione è indotta al polo positivo e quella di riduzione al polo negativo, dunque anodo e catodo si invertono di significato rispetto alle celle galvaniche. È nel contesto delle celle elettrolitiche che vengono definite le correnti *anodica* e *catodica*, rispettivamente legate al flusso di elettroni dalla soluzione verso l'elettrodo e dall'elettrodo verso la soluzione.

Si osservi inoltre che a differenza delle celle galvaniche, in cui gli elettroni in moto tra i due elettrodi venivano forniti dal processo di ossidazione all'anodo, nel processo di elettrolisi è concettualmente la sorgente DC ad agire da fonte primaria di carica; il processo innesca in un secondo momento l'ossidazione degli ioni all'anodo che provvede a reimmettere elettroni nel circuito. Se cessasse l'apporto della sorgente DC il processo, non spontaneo, verrebbe immediatamente interrotto.

Ora, l'elettrolisi presenta un problema intrinseco: le specie molecolari NaOH, H<sub>2</sub> e Cl<sub>2</sub>, generate attraverso l'apporto di energia nel processo di elettrolisi, tendono a subire il processo ossidoriduttivo inverso (per quanto idrogeno e cloro essendo gassosi tendano a uscire dal sistema), un pò come una palla alla quale sia stata data energia potenziale dall'esterno, sollevandola, tende appena possibile a rilasciare quella energia cadendo. In

altre parole all'interno della cella elettrolitica è virtualmente presente una cella galvanica la cui f.e.m. (detta in questo contesto *forza controelettromotrice*) si oppone alla circolazione di corrente e quindi al processo di elettrolisi. Il minimo valore di tensione oltre il quale è possibile avviare l'elettrolisi è quindi pari in modulo alla forza controelettromotrice e prende il nome di *tensione di decomposizione elettrolitica*.

In alcuni casi, dipendenti dal materiale impiegato come elettrodo, per avviare il processo di elettrolisi può essere necessario dover applicare un extra di tensione (detto *sovratensione*, in inglese *overpotential*) rispetto alla tensione di decomposizione elettrolitica. L'effetto si spiega con la necessità di muovere il livello di Fermi dell'elettrodo per favorire la transizione degli elettroni; la tematica è quella tipica dei diagrammi a bande affrontata nei corsi di microelettronica e si assume nota al lettore. Si faccia attenzione che in letteratura è comune trovare il termine *sovratensione* inteso anche come la differenza tra la tensione applicata (intenzionalmente più alta) e quella minima necessaria a innescare il processo di elettrolisi; la scelta di usare tensioni maggiori di quelle minime necessarie è giustificabile con l'incremento della velocità di reazione agli elettrodi.

### 1.2.3 Equazione di Butler-Volmer e reversibilità di un processo

Introduciamo ora una descrizione della corrente circolante nella cella elettrolitica. Questa è il punto di arrivo di un processo che nella sua schematizzazione elementare consta di tre passi:

1. trasporto di specie elettroattive verso l'elettrodo, processo guidato dal campo elettrico  $\xi$  ma ostacolato dai moti browniani e di convezione degli ioni e dalla viscosità della soluzione (argomenti ripresi in sezione 1.5) ;
2. trasferimento elettronico all'interfaccia elettrodo-soluzione;
3. allontanamento dei prodotti di reazione dall'elettrodo verso il bulk della soluzione.

È immediato vedere come i fattori limitanti del processo possano essere due:

- un basso tasso di scambio elettronico equivalente a una bassa velocità di reazione redox (punto 2);
- una bassa velocità di trasporto di massa, così che la reazione sia limitata da un lento trasferimento dei reagenti verso il sito di reazione (punto 1) oppure da un lento allontanamento dei prodotti tale da ostacolare l'accesso ai nuovi reagenti (punto 3).

La relazione tra potenziale applicato e corrente della cella elettrolitica è espressa dall'equazione di Butler-Volmer:

$$(1.24) \quad I = j_0 A \left( \frac{[O]_o}{[O]_{bulk}} e^{-\alpha \frac{nF\eta}{RT}} - \frac{[R]_o}{[R]_{bulk}} e^{(1-\alpha) \frac{nF\eta}{RT}} \right)$$

dove  $A$  è l'area dell'elettrodo interessata da fenomeni di scambio elettronico e il fattore  $RT/nF$  è stato introdotto parlando dell'equazione di Nernst (1.9).  $[O]$  ed  $[R]$  indicano la concentrazione della specie redox nelle forme rispettivamente ossidata e ridotta; i pedici  $o$  e  $bulk$  si riferiscono rispettivamente alla superficie dell'elettrodo e al bulk della soluzione. Il termine  $j_0$  è detto *densità di corrente di scambio* ed è pari in modulo alla densità di corrente che fluisce in entrambe le direzioni (da elettrodo a soluzione e viceversa) in condizioni di corrente totale nulla, ovvero per tensione applicata pari alla tensione di decomposizione elettrolitica. Il termine  $\eta$  è la differenza tra la tensione applicata e la tensione di decomposizione elettrolitica, ovvero la *sovratensione* nella seconda delle accezioni sopra



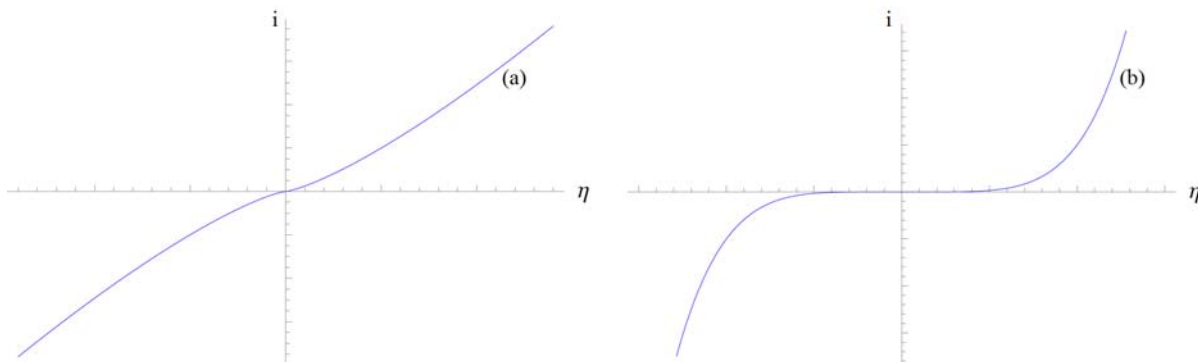


Figura 1.6: Reazioni reversibili (a) e irreversibili (b), andamento qualitativo della relazione corrente-sovratensione.

indicate. Il termine  $\alpha$ , adimensionale e compreso tra 0 e 1, è detto *coefficiente anodico di trasferimento di carica* ed è legato all'energia di attivazione del processo redox; valori tipici di  $\alpha$  si situano intorno a 0.5. I due addendi tra parentesi esprimono rispettivamente il contributo anodico e catodico alla corrente netta totale.

Nel caso in cui il processo non sia limitato dal trasferimento di massa si può assumere uniforme la concentrazione della specie redox in soluzione tanto nella forma ossidata quanto nella ridotta e la (1.24) si riduce a:

$$(1.25) \quad I = j_0 A \left( e^{-\alpha \frac{nF\eta}{RT}} - e^{(1-\alpha) \frac{nF\eta}{RT}} \right)$$

La relazione (1.24) contiene al suo interno due importanti sottocasi che ci proponiamo ora di evidenziare (si veda anche la Figura 1.6):

1. caso detto di *processo reversibile* o *nernstiano*, tipico dei sistemi in cui la cinetica del trasferimento elettronico agli elettrodi è molto veloce. In questo scenario si hanno grandi valori di  $j_0$ , così che sono sufficienti piccoli valori di  $\eta$  per guidare la reazione, ovvero per registrare il passaggio di corrente. La corrente fluisce prontamente in entrambe le direzioni (anodica e catodica) in accordo col segno di  $\eta$ . La corrente netta inoltre riceverà contributi significativi da entrambe le componenti anodica e catodica, eccetto che per valori di  $\eta$  molto positivi (negativi) per i quali la componente anodica (catodica) diventa trascurabile.
2. caso detto di *processo irreversibile*. Per piccoli valori di  $j_0$  è richiesto un grande sovrapotenziale  $\eta$  per indurre una corrente sensibile nel sistema. In corrispondenza, come detto nel punto precedente, una delle due componenti di corrente tra anodica e catodica risulterà essere trascurabile.

Riepilogando, il termine "reversibile" indica che entrambe le componenti anodica e catodica contribuiscono significativamente eccetto che per grandi valori di sovrapotenziale; il termine "irreversibile" invece si collega all'idea che il processo all'elettrodo, quando indotto, proceda solamente in una direzione.

In termini più generali rispetto alla relazione (1.24) è infine valida la relazione, assai più semplice:

$$(1.26) \quad I = nAFj_r$$

dove  $I$  è la corrente che fluisce all'elettrodo,  $A$  l'area dell'elettrodo interessata dal fenomeno di elettrolisi,  $F$  la costante di Faraday e  $j_r$  il flusso di reagenti che raggiungono l'elettrodo scambiando con esso  $n$  elettroni. Le unità di misura di  $I$ ,  $A$ ,  $F$  e  $j_r$ , rispettivamente [A],

$[m^2]$ ,  $[C\ mol^{-1}]$  e  $[mol\ m^{-2}s^{-1}]$ , giustificano già da sole tale relazione nell'ipotesi che i reagenti affluenti all'elettrodo siano tutti effettivamente coinvolti nella reazione di scambio elettronico. Questa relazione, come la precedente (1.24), mette in evidenza la presenza di un grado di libertà (l'area  $A$ ) sul quale è possibile agire esternamente.

Va sottolineato che in questa discussione abbiamo considerato solo correnti faradiche, ovvero derivanti da scambi elettronici redox all'interfaccia elettrodo-soluzione, ignorando contributi non faradici come le *correnti capacitive* o *di double-layer*; queste ultime caricano e scaricano le capacità associate all'interfaccia in risposta a variazioni della tensione applicata o a variazioni del valore di capacità, per esempio indotte da variazioni di temperatura o dell'area attiva dell'elettrodo. È facile intuire come in alta frequenza le correnti capacitive contribuiscano in modo non trascurabile alla corrente totale. Sulla modellizzazione dell'interfaccia si rimanda alla sezione 2.3.1.

## 1.2.4 Celle a tre elettrodi

Le relazioni di equilibrio sviluppate in sezione 1.1 utilizzavano l'ipotesi di equipotenzialità tra le soluzioni in cui gli elettrodi sono immersi. In presenza di un flusso di carica invece si avrà una caduta di potenziale internamente alla soluzione; questa è dovuta alla soluzione stessa, la cui viscosità ostacola il moto delle specie ioniche al suo interno ed è pertanto modellizzabile come una resistenza. Il problema può essere superato in due modi:

- lavorando con correnti di entità piccola o trascurabile, condizione operativa tipica dei cosiddetti *microelettrodi*;
- aggiungendo alla soluzione un elettrolita non coinvolto nella reazione redox e tale da aumentare la conducibilità della soluzione. Questo argomento viene ripreso in sezione 1.5.4.

Qualora la corrente non sia trascurabile resta tuttavia irrisolto un altro problema: il passaggio di corrente attraverso l'elettrodo di riferimento può modificarne la stabilità compromettendone l'affidabilità, specie su misure di lunga durata. Per ovviare a questo problema si ricorre a sistemi a tre elettrodi formati da:

- l'elettrodo operativo, che in questo contesto prende il nome di *elettrodo di lavoro* o *working electrode* (WE);
- l'elettrodo di riferimento (RE), rispetto a cui saranno riferiti i valori di tensione e attraverso il quale si ha cura di non far passare alcuna corrente così da non degradarne le prestazioni;
- un elettrodo di supporto, che chiude il circuito convogliando su di sé tutta la corrente elettrica da e verso l'elettrodo di lavoro. Prende il nome di *elettrodo ausiliario* o *contro-elettrodo* (CE - counterelectrode).

## 1.2.5 Notazione convenzionale

In una cella è convenzione indicare ciascun semi-elemento con una scrittura a due campi in cui si riportano, divise tra elettrodo e soluzione, solo le specie che prendono parte alla ossidoriduzione e al trasporto di elettroni tra semi-celle. Di ogni specie si indica lo stato di aggregazione. Per specie in soluzione si indica la concentrazione o l'attività; per specie gassose la pressione o la fugacità. Una barra verticale indica un'interfase, due barre il ponte salino (per membrane porose si userà il simbolo di due punti ")."). Anodo e catodo vengono scritti rispettivamente come elemento di sinistra e di destra.

Per fare un esempio, la pila Daniell descritta in sezione 1.2.1 viene scritta convenzionalmente come:



## 1.3 Elettrodi di riferimento

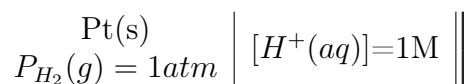
Gli elettrodi di riferimento sono elettrodi *non polarizzabili*, ovvero tali che la differenza di potenziale tra soluzione ed elettrodo non dipende dall'azione di generatori di tensione esterni bensì solamente dalla struttura dell'interfaccia, quindi dalla specifica coppia soluzione-elettrodo impiegata. Questo risultato viene reso possibile di base attraverso due accorgimenti, descritti nel seguito.

### 1.3.1 Elettrodo di riferimento standard a idrogeno

La seconda possibilità viene implementata in elettrodi detti *elettrodi a gas* o *di quarta specie* e costituiti da un metallo inerte che interagisce con un gas e con una soluzione contenente ioni dello stesso gas. L'elettrodo SHE è di questo tipo. Esso è costituito da un'anima in platino su cui viene depositato un layer spugnoso di platino così da aumentare l'area attiva dell'elettrodo (la reazione redox avviene alla superficie) e incrementare l'interazione per adsorbimento coi reagenti. L'elettrodo è poi immerso in una soluzione acida 1M (1 molare) di ioni  $\text{H}^+$  per i quali si assume unitario il coefficiente di attività; idrogeno gassoso alla pressione di 1 atm viene insufflato nella soluzione.

La reazione che interessa il sistema è  $2\text{H}^+(\text{aq}) + 2\text{e}^- \rightleftharpoons \text{H}_2(\text{g})$ , nella quale il platino funge da catalizzatore secondo una reazione più complessa qui non riportata. L'idrogeno gassoso prodotto tende ad abbandonare la soluzione e per questo motivo va continuamente insufflato così che la reazione resti in equilibrio. In questo modo si mantengono costanti i valori di attività dell'idrogeno, sia gassoso che disciolto, e quindi (equazione (1.10)) anche il potenziale.

La notazione convenzionale per questo elettrodo è:



### 1.3.2 Elettrodo di riferimento in argento/argento cloruro

La prima possibilità consiste nel fare uso di elettrodi costituiti da un metallo (ad esempio argento, Ag) ricoperto da un suo sale poco solubile (ad esempio cloruro d'argento, AgCl) mentre in soluzione sono presenti gli anioni dello stesso sale (ioni  $\text{Cl}^-$ ). Per l'elettrodo ad argento/argento cloruro la reazione che intercorre è  $\text{AgCl(s)} + \text{e}^- \rightarrow \text{Ag(s)} + \text{Cl}^-$  e in corrispondenza l'equazione di Nernst (1.10) per  $T = 25^\circ$  diventa:

$$(1.27) \quad E \stackrel{1.10}{=} E^\phi + 0.0592 \log \left( \frac{1}{a_{\text{Cl}^-}} \right) = 0.230 - 0.0592 \log(a_{\text{Cl}^-})$$

ovvero l'elettrodo risponde all'attività di uno ione (l'anione in soluzione) il cui valore può essere mantenuto costante semplicemente saturandone la concentrazione in soluzione; così facendo si mantiene costante il valore di potenziale a 0.197 V. Elettrodi di questo tipo



sono detti *di seconda specie*. La notazione convenzionale per l'elettrodo Ag/AgCl è: In assenza di saturazione è importante che il valore di concentrazione del cloro disciolto sia mantenuto perlomeno costante.

### 1.3.3 Pseudo-riferimenti

Tra gli elettrodi di riferimento impiegati comunemente esiste una sottoclasse particolare detta degli *elettrodi di pseudo-riferimento*. Si tratta di elettrodi in cui la differenza di potenziale rispetto alla soluzione in cui sono immersi è funzione dello stato del sistema elettrochimico. Ne consegue che il valore di potenziale può essere costante ma ignoto a priori come anche variare nel tempo insieme al sistema. Qualora sia necessario conoscere il valore di potenziale dello pseudo-riferimento rispetto all'elettrodo SHE (il termine  $E_2$  di equazione (1.13)) è possibile aggiungere in soluzione un composto redox che esibisca comportamenti noti a precisi valori di potenziale definiti rispetto all'elettrodo SHE. Se ad esempio il composto presenta un comportamento caratteristico a 0.4V rispetto all'elettrodo SHE e tale comportamento si rileva in cella a 0.3V se ne ricava che il potenziale dello pseudo-riferimento rispetto all'elettrodo SHE vale 0.1V.

Gli elettrodi di pseudo-riferimento più semplici possono essere fili o piste di metallo inseriti a diretto contatto con la soluzione.

## 1.4 Cella elettrochimica DropSens DRP110

Per le misure riportate nella presente Tesi si è fatto uso di celle elettrochimiche a tre elettrodi su supporto ceramico, prodotte dall'azienda spagnola DropSens ([www.dropsens.com](http://www.dropsens.com)). Il dispositivo è riportato in Figura 1.7. L'elettrodo di lavoro e il contro-elettrodo sono realizzati in carbonio; il terzo elettrodo è uno pseudo-riferimento in argento (sezione 1.3.3). I contatti sono realizzati in argento. La tecnica costruttiva è la stampa da inchiostro o *serigrafia* (*screen-printing*). Nel corso della presente Tesi questo dispositivo sarà spesso indicato con la sigla DSC (DropSens Carbon).

In questo tipo di dispositivo la soluzione viene aggiunta manualmente sulla superficie sotto forma di goccia (100  $\mu l$ ) ed è quindi condivisa da entrambe le semi-celle. La superficie del dispositivo è pensata per agevolare il posizionamento della goccia: la corona circolare centrale, tra gli elettrodi, è idrofila (ceramica bianca), quella esterna è idrofoba (patina celeste).

La rilevazione di molecole di interesse biologico attraverso questi dispositivi può essere realizzata:

- per via diretta, misurandone la presenza in soluzione attraverso le tecniche descritte in sezione 2.1;
- per via mediata, rilevando la presenza di un prodotto di reazione (chimica o redox) generato in soluzione in seguito all'aggiunta di opportune sostanze. Una via molto esplorata consiste nel rilevare la presenza di un prodotto generato da catalisi enzimatica. In questo secondo caso è possibile disciogliere in soluzione l'enzima, come anche farlo aderire alla superficie di uno degli elettrodi (processo detto di *funzionalizzazione*).

Diventa quindi chiaro che il dispositivo elettrochimico stesso, eventualmente pre-trattato, costituisce il biosensore. Dispositivi monouso con questa architettura sono oggi sempre più impiegati in ricerca e in diagnostica per via dell'economicità e della praticità di utilizzo.

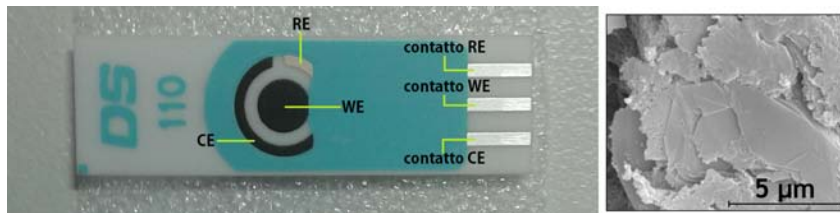


Figura 1.7: A sinistra, un moderno dispositivo a tre elettrodi DropSens DRP110 con elettrodo di lavoro e contro-elettrodo in carbonio e pseudo-riferimento in argento; tecnica di deposizione: serigrafia (*screen-printing*). A destra un'immagine al microscopio elettronico a scansione (SEM) della superficie dell'elettrodo di lavoro [fonte: datasheet del dispositivo, [www.dropsens.com/en/pdfs\\_productos/new\\_brochures/110-c110.pdf](http://www.dropsens.com/en/pdfs_productos/new_brochures/110-c110.pdf)].

## 1.5 Trasporto di massa

La cinetica di una qualsiasi reazione chimica è influenzata da molti fattori:

- energia di attivazione della reazione
- grado di reversibilità della reazione
- temperatura
- presenza di acceleranti (catalizzatori)
- concentrazione dei reagenti
- superficie di contatto tra specie reagenti

Gli ultimi due punti esprimono la probabilità dei reagenti di interagire tra loro. Un processo faradico come quello fin qui trattato non avviene ovunque nella soluzione bensì è localizzato all'interfaccia soluzione-elettrodo, pertanto è necessario che i reagenti siano in grado di raggiungere l'interfaccia e che i prodotti se ne allontanino per fare spazio a nuovi reagenti. Questo processo è spesso il fattore che limita la cinetica dell'intera reazione; di conseguenza diventa importante considerare le dinamiche di trasporto di reagenti e prodotti nella soluzione, ovvero le dinamiche di *trasporto di massa*.

I processi di trasporto di massa sono diffusione, deriva e convezione, i primi due già noti dai corsi di elettronica. In questa sezione ci concentreremo non tanto sulla loro trattazione matematica, alla quale dedicheremo solo qualche cenno, quanto sulle loro interazioni.

### 1.5.1 Diffusione

Il processo di diffusione si attiva in presenza di gradienti di concentrazione e agisce nella direzione della loro minimizzazione, così da massimizzare l'entropia del sistema.

Nell'ipotesi di stato stazionario la diffusione è descritta nella coordinata spaziale dalla prima legge di Fick:

$$(1.28) \quad j = -D_B \frac{\partial[B]}{\partial x}$$

dove  $j$  è il flusso della specie chimica B diffondente,  $[B]$  ne è la concentrazione molare e  $D_B$  è detto *coefficiente di diffusione* o *diffusività* ed è una proprietà di B. Le unità di misura, sottomultipli a parte, sono rispettivamente  $[mol/(m^2s)]$ ,  $[mol/m^3]$  e  $[m^2/s]$ . Si osservi che la relazione (1.28), per come è scritta, descrive un processo di diffusione che avvenga lungo

una sola direzione spaziale; un caso non atipico, se si considera come origine del sistema la posizione dell'elettrodo e come direzione di diffusione quella ortogonale alla superficie dell'elettrodo. Qualora si voglia una descrizione nelle tre dimensioni spaziali il simbolo di derivata nella (1.28) va sostituito con quello di gradiente.

Nell'ipotesi che la diffusività  $D_B$  sia isotropa (uniforme nelle tre direzioni spaziali) la diffusione è descritta nella coordinata temporale dalla seconda legge di Fick:

$$(1.29) \quad \frac{\partial[B]}{\partial t} = D_B \frac{\partial^2[B]}{\partial x^2} + D_B \frac{\partial^2[B]}{\partial y^2} + D_B \frac{\partial^2[B]}{\partial z^2} = D_B \nabla^2[B]$$

che nel caso unidimensionale assume la forma semplificata:

$$(1.30) \quad \frac{\partial[B]}{\partial t} = D_B \frac{\partial^2[B]}{\partial x^2}$$

Per completezza riportiamo che mancando l'ipotesi di isotropia della diffusività la (1.29) non può che esprimersi nella forma più generale:

$$(1.31) \quad \frac{\partial[B]}{\partial t} = \nabla \cdot \nabla(D_B[B])$$

## 1.5.2 Deriva

Come verrà discusso nel Capitolo 2.3, all'interfaccia soluzione-elettrodo si viene a instaurare un campo elettrico  $E_{se}$ . Ogni molecola carica nella regione interessata dal campo risentirà della forza elettrostatica che esso esercita e si sposterà in accordo alla propria polarità. Si viene così a instaurare un flusso  $j_{drift}$  di ioni descrivibile come:

$$(1.32) \quad j_{drift} \propto -u[B]E_{se}$$

dove  $[B]$  al solito è la concentrazione molare (in questo caso della specie ionizzata);  $u$  è definita *mobilità ionica* e vale:

$$(1.33) \quad u = \frac{|z|q}{6\pi\eta r}$$

dove  $z$  è la valenza dello ione,  $q$  il quanto elementare di carica (dunque  $|z|q$  è la carica dello ione in modulo),  $\eta$  la viscosità del fluido in cui lo ione si sposta e  $r$  il suo raggio idrodinamico, concetto ripreso in sezione 2.3.1 e in Appendice A.1.

## 1.5.3 Convezione

Il trasporto convettivo di massa in una soluzione si origina qualora agiscano forze meccaniche. Si distingue tra convezione naturale e forzata.

La convezione naturale si origina all'interno del sistema in presenza di differenze di densità tra le sue parti. Ad esempio i prodotti di reazione generati all'elettrodo possono avere densità diversa rispetto alla soluzione e muoversi di conseguenza (affondare se più densi, risalire verso la superficie se meno densi). Il fenomeno può essere indotto o agevolato da variazioni di temperatura tra le parti del sistema (riscaldamento implica dilatazione quindi minore densità) che a sua volta può trarre origine dal carattere eso- o endo-termico della reazione in corso all'elettrodo. La convezione naturale è una perturbazione rilevante sulla scala dei secondi; inoltre, è di difficile modellizzazione e in quanto tale è complicata da prevedere.

La convezione forzata è dovuta all'azione di forze originate all'esterno del sistema, spesso artificialmente. Essa può essere realizzata sia mettendo in moto l'elettrodo rispetto alla soluzione che effettuando l'operazione inversa. Nella prima categoria rientrano gli elettrodi a disco rotante (RDE, Rotating Disk Electrode), sistemi in cui l'elettrodo ruota a velocità angolare costante garantendo un moto convettivo radiale dal centro del disco verso l'esterno (Figura 1.8); questo garantisce l'approvvigionamento di reagenti e l'espulsione dei prodotti di reazione dalla zona di interfaccia. Nella seconda categoria invece è

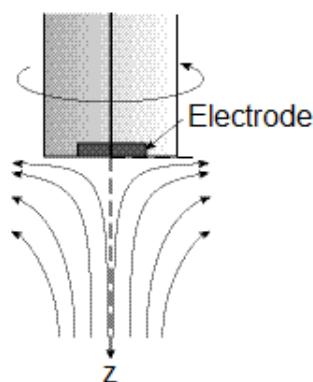


Figura 1.8: Linee di flusso laminare in un elettrodo a disco rotante [fonte: <http://compton.chem.ox.ac.uk/john/Thesis/1/1.html>].

frequente l'uso di pompe e miscelatori o l'iniezione di gas nella soluzione. Un esempio è riportato in Figura 1.9.

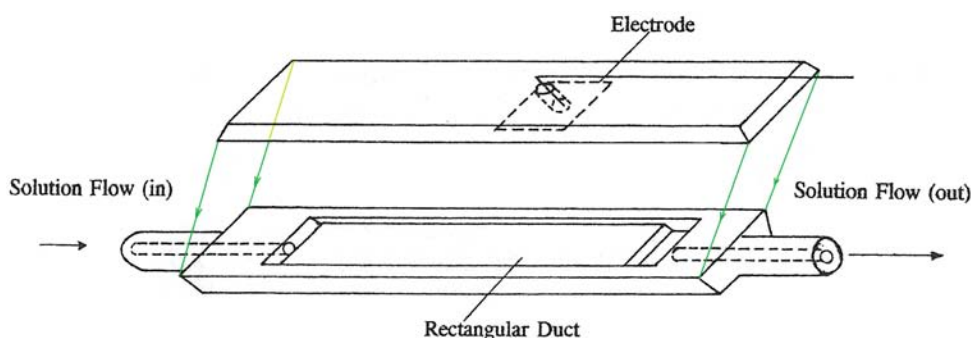


Figura 1.9: Elettrodo a canale. La soluzione è pompata meccanicamente verso un elettrodo fisso [fonte: [1, p. 22]].

#### 1.5.4 Tecniche di controllo del trasporto

La contemporanea presenza di diffusione, deriva e convezione può risultare in dinamiche di trasporto complesse. I tre fenomeni possono coesistere come anche influenzarsi pesantemente; a titolo di esempio, i moti di convezione fanno cadere l'ipotesi di isotropia su cui si basa la formula (1.29). Risulta evidente che se si riuscisse a rendere uno dei tre fenomeni di trasporto prevalente sugli altri due si avrebbe molto da guadagnare.

La deriva è il fenomeno più instabile per via del feedback che si origina con l'elettrolisi. In presenza di elettrolisi cambiano le concentrazioni delle specie ioniche all'interfaccia soluzione-elettrodo. Conseguentemente cambia il potenziale all'interfaccia e dunque il campo elettrico, su cui si basa il fenomeno della deriva. Questo modifica il trasporto di massa e quindi la velocità di reazione (per le motivazioni esposte all'inizio di questo

Capitolo). Il fenomeno nel suo complesso è difficile da descrivere e da controllare, dunque vogliamo rendere la deriva stabile oppure trascurabile. È possibile ottenere il secondo risultato attraverso l'impiego di un *elettrolita di supporto* (*background electrolyte*) elettrochimicamente inerte. Aggiunto in grande concentrazione alla soluzione (anche 100 volte la concentrazione dei reagenti) esso agisce positivamente su più livelli:

- data l'alta concentrazione, l'elettrolita di supporto circonda l'elettrodo operando da schermo nei confronti della soluzione. Così facendo si impedisce al campo elettrico di estendersi nella soluzione, riducendo di molto l'attrazione elettrostatica che l'elettrodo esercita nei confronti dei reagenti disciolti. In questo modo viene resa trascurabile la componente di corrente di deriva;
- aumenta la conducibilità elettrica della soluzione;
- rende la forza ionica della soluzione pressoché insensibile alle variazioni introdotte dall'elettrolisi. Così facendo mantiene circa costanti i valori di attività di reagenti e prodotti e quindi il tasso di reazione. Questo consente (equazione (1.9)) di mantenere costante il potenziale di elettrodo necessario al processo di elettrolisi.

Si osservi che avere confinato il campo elettrico in una regione di spazio più piccola ( $10 \div 20 \text{ \AA}$ ) fa sì che un meccanismo importante di trasporto degli elettroni tra elettrodo e soluzione sia l'effetto tunnel.

L'impiego dell'elettrolita di supporto rende trascurabile il trasporto di massa per deriva. Questo deve quindi avvenire per diffusione, per convezione o attraverso una combinazione controllata delle due.

Per descrivere la dinamica di trasporto nel primo caso (possibile posto che i moti convettivi siano trascurabili) risulta utile definire il concetto di *layer di diffusione*. Consideriamo per semplicità che la reazione di elettrolisi coinvolga un solo reagente B. Assumiamo che all'elettrodo non sia applicato alcun potenziale; la concentrazione molare di reagente [B] è quindi costante in tutta la soluzione. Al tempo  $t_0$  applichiamo un potenziale all'elettrodo. In prossimità dell'interfaccia soluzione-elettrodo il reagente viene consumato, dando origine a un gradiente di concentrazione col bulk lungo la direzione  $x$  ortogonale alla superficie dell'elettrodo; la regione di spessore  $\delta$  compresa tra elettrodo e bulk, ovvero quella in cui [B] differisce dal valore di bulk, costituisce il layer di diffusione. L'ampiezza del layer aumenta man mano che la reazione di elettrolisi avanza (Figura 1.10). Analizziamo la cosa più nel dettaglio, con riferimento alle figure 1.10 e 1.11.

Al tempo  $t_1$  la concentrazione [B] in P e Q è quella del bulk. Le molecole in P diffondono nella direzione negativa dell'asse  $x$  a seguito del gradiente di concentrazione esistente. Le molecole in Q invece non subiscono processi di diffusione dal momento che localmente non sono presenti gradienti di concentrazione. Il profilo di diffusione di Figura 1.10 resterebbe inalterato solo a patto che parte delle molecole presenti in Q potessero spostarsi in P, rimpiazzando quelle diffuse fino a riportare la concentrazione in P al valore del bulk. Questo non è possibile perché

1. spostando da Q a P un numero di molecole sufficiente a ripristinare in P la concentrazione del bulk, la concentrazione [B] in Q scende sotto al valore di  $[B]_{bulk}$ . Esisterà quindi un momento in cui  $[B]_P = [B]_Q < [B]_{bulk}$ ; da quel momento in poi, ogni ulteriore spostamento di materia da P a Q si muoverebbe contro il gradiente di concentrazione tra le due regioni e dunque non potrebbe verificarsi attraverso un moto di diffusione (detto altrimenti, spostare ulteriore materia da Q a P renderebbe  $[B]_P > [B]_Q$  e quindi si tratterebbe di un moto nella direzione opposta a quella naturale di diffusione). Dal momento che per ipotesi non sono presenti altri meccanismi di trasporto oltre alla diffusione ne consegue che questo moto non è realizzabile;



2. se anche fosse possibile riportare la concentrazione  $[B]_P$  al valore di bulk, lo stesso problema si ripresenterebbe in Q e via via a ritroso su ogni altra microsezione della soluzione, per la quale ripristinare la concentrazione  $[B]_{bulk}$  sarebbe impossibile mancando sorgenti di reagente B (è anzi presente un pozzo, dal momento che l'elettrolisi consuma il reagente).

Se ne conclude che dovrà essere  $[B]_P < [B]_{bulk}$  e dunque il profilo di concentrazione al tempo  $t_2 > t_1$  sarà quello riportato in Figura 1.10.

Il continuo aumento di spessore del layer di diffusione è in realtà una condizione vera

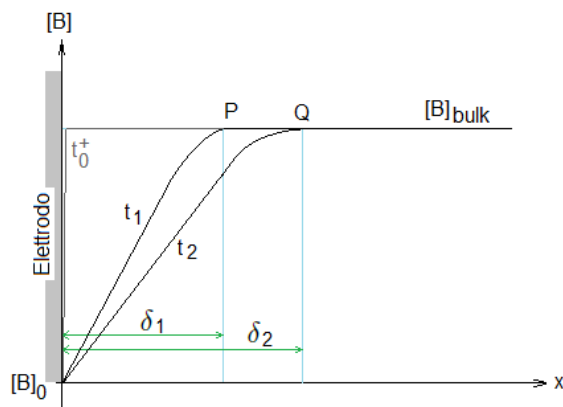


Figura 1.10: Profilo di diffusione del reagente B ai tempi  $t_1$  e  $t_2 > t_1$ .  $[B]_0$  è la concentrazione alla superficie dell'elettrodo. In verde l'ampiezza  $\delta$  del layer di diffusione.

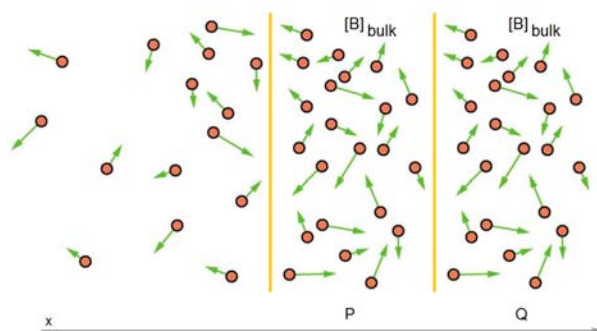


Figura 1.11: Visione molecolare del profilo di diffusione di Figura 1.10 al tempo  $t_1$  [fonte: rielaborazione di immagine prelevata da <http://cnx.org/content/m42212/latest/?collection=col11406/latest>].

solo nei primi secondi dall'applicazione di potenziale all'elettrodo; trascorso questo tempo lo spessore  $\delta$  si assesta su un valore di regime  $\delta_d$  dell'ordine delle centinaia di  $\mu m$ . Il responsabile è la convezione naturale, ineliminabile, che fa cadere l'ipotesi su cui si basava il precedente punto 1. determinando un rimescolamento della soluzione nella regione di bulk. Tuttavia il valore di  $[B]_{bulk}$  calerà nel tempo, restando vero quanto detto al punto 2.

All'interno del layer, per definizione, l'unico fenomeno di trasporto presente è ancora la diffusione. Questo ci consente di applicare la descrizione matematica introdotta in sezione 1.5.1 e scrivere che il flusso  $j_r$  di reagente verso la superficie dell'elettrodo è:

$$(1.34) \quad j_r \stackrel{1.28}{=} D_B \frac{[B]_{bulk} - [B]_0}{\delta_d} \stackrel{1.26}{=} \frac{i}{nFA}$$

Il valore massimo di corrente viene raggiunto per  $[B]_0 = 0$ . Questo può essere ottenuto aumentando il potenziale applicato all'elettrodo (effetto della sovratensione nella sua seconda accezione, sezione 1.2.2); in corrispondenza la (1.34) diventa:

$$(1.35) \quad i = \frac{nD_B[B]_{bulk}AF}{\delta_d}$$

Tornando ai meccanismi di trasporto, la seconda delle possibilità elencate consiste nel rendere dominante il trasporto per convezione. In questo caso verrà preferita la convezione forzata, che rispetto al trasporto convettivo naturale garantisce due importanti benefici: da un lato si tratta di un processo controllabile, quindi descrivibile matematicamente; dall'altro il suo contributo (prevedibile) al moto convettivo totale vince su quello (caotico ma ineliminabile) della convezione naturale, garantendo la ripetibilità delle misure. Qualora la convezione forzata costituisca il meccanismo di trasporto dominante nel sistema si parla più propriamente di *sistemi a elettrodo idrodinamico*. Un parametro fondamentale di questi sistemi è il *numero di Reynolds*, valore adimensionale che descrive il tipo di moto (laminare o turbolento) della soluzione. Ai fini del controllo è intuitivo che si desideri mantenere il sistema in condizioni di moto laminare.

Infine è possibile avere sistemi in cui il trasporto di materiale da e verso l'elettrodo sia dovuto alla contemporanea presenza di diffusione e convezione forzata. È convenzione in questo caso mantenere i concetti di layer di diffusione e spessore  $\delta_d$ , introducendo dei termini correttivi che tengano conto, nelle formule, della presenza di convezione forzata. Non ci soffermeremo su questo argomento; è comunque intuitivo per i discorsi fin qui svolti che i moti convettivi ostacoleranno la diffusione così che il valore di  $\delta_d$  risulterà essere minore di quello che si avrebbe in assenza di convezione.

# Capitolo 2

## Tecniche di misura

### 2.1 Ciclovoltammetria

La ciclovoltammetria (spesso abbreviata come CV nei testi anche inglesi, stante per *Cyclic Voltammetry*) rientra nella più generale categoria delle tecniche di misura voltamperometriche; in essa si inseriscono tutte le metodologie che si propongono di studiare le celle elettrochimiche attraverso l'applicazione di un segnale di tensione noto, misurando poi in uscita al sistema un segnale di corrente. Nelle prossime sezioni verrà descritta la tecnica di misura e le principali informazioni che da tale tecnica si possono ricavare sul sistema elettrochimico in esame.

#### 2.1.1 Concetti teorici e tecnica di misura

In una misura ciclovoltammetrica il segnale di potenziale è applicato a una cella elettrochimica a tre elettrodi nella quale si possa supporre che il trasporto di massa da e verso l'elettrodo faccia affidamento solo sulla diffusione. La cella elettrochimica sia tale da contenere in soluzione una specie redox avente potenziale di riduzione  $E_e$  definito dall'equazione di Nernst (1.9); si assuma per semplicità che la cella faccia uso di un elettrodo di riferimento standard a idrogeno. Il segnale di tensione applicato in ingresso al sistema è descritto in Figura 2.1 e consiste, a meno di un transitorio iniziale, in un'onda triangolare di pendenza simmetrica sulle due rampe (crescente e calante) costituenti ciascuna un semiperiodo dell'onda. Il modulo di tale pendenza sui punti non angolosi del semiperiodo:

$$(2.1) \quad \left| \frac{dV}{dt} \right| \triangleq \nu$$

assume particolare rilevanza nell'analisi delle tracce ciclovoltammetriche e prende il nome di *scan rate*, spesso abbreviato come *SR*. Valori tipici di scan rate si collocano nell'intervallo  $10 \text{ mV/s} \div 1000 \text{ V/s}$ . Appoggiandoci alla Figura 2.2 ci proponiamo ora di descrivere qualitativamente la forma d'onda di corrente che si rileva in uscita al sistema; la descrizione quantitativa è demandata alle sezioni successive. Segnaliamo fin da subito che il segno della corrente è funzione della convenzione scelta; nei testi di elettrochimica è comune trovare entrambe le convenzioni: corrente catodica positiva (notazione polarografica) oppure corrente anodica positiva (notazione IUPAC). In questa Tesi verrà impiegata la prima delle due.

Si consideri di iniziare la misura a un valore di tensione inferiore in modulo a  $E^0$ , quindi tale che in sua corrispondenza la specie redox non vada incontro a riduzione: niente trasferimento elettronico, corrente iniziale nulla. Spostando il potenziale applicato verso valori più riducenti (più negativi) si arriva, raggiunto  $E^0$ , a indurre la riduzione della

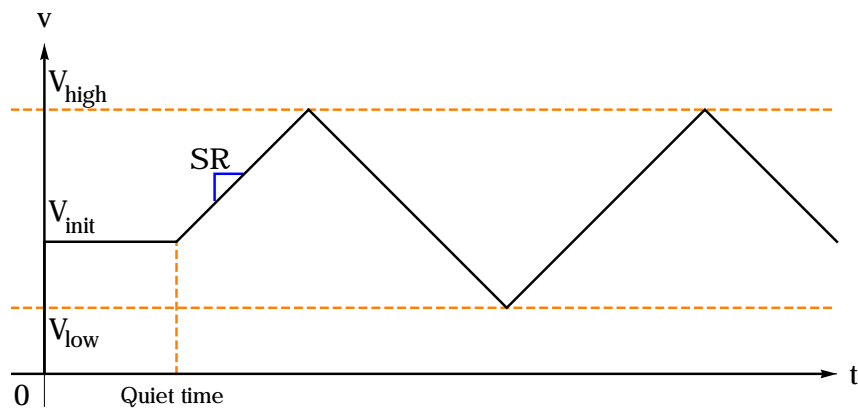


Figura 2.1: Ciclovoltammetria, segnale di potenziale in ingresso al sistema. Il potenziale  $V_{init}$  viene applicato costante per una durata definita dal parametro *Quiet time* (tempo di attesa); successivamente il segnale diventa una rampa di pendenza in modulo pari a  $\nu$  per un intervallo di tempo definito dal raggiungimento di  $V_{high}$ , per poi invertirsi (mantenendo in modulo la pendenza) fino al raggiungimento del potenziale  $V_{low}$ . Ogni semiciclo del segnale periodico è definito *sweep*. Il segno della pendenza della prima rampa trascorso il tempo di attesa (positivo, nell'esempio in Figura) è definito dal parametro *initial scan polarity*.

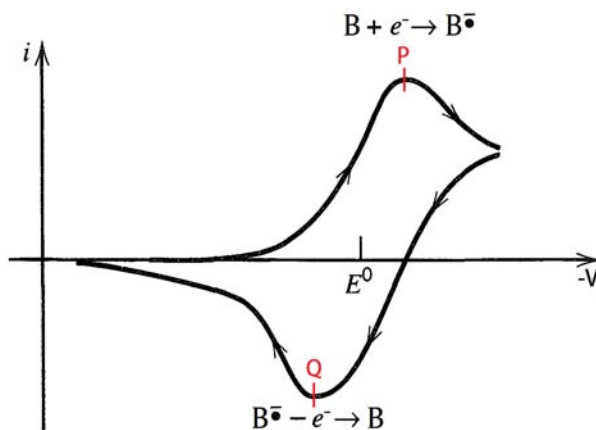


Figura 2.2: Ciclovoltammetria, andamento qualitativo della corrente misurata con notazione polarografica. Sono evidenziati i picchi di corrente di riduzione (punto P) e ossidazione (punto Q) della specie redox B disciolta in soluzione. I simboli B e  $B^\bullet$  indicano rispettivamente la forma ossidata e ridotta della specie redox;  $E^0$  è il valore in modulo del potenziale di riduzione, che per semplicità possiamo assumere standard [fonte: rielaborazione di immagine prelevata dalla fonte [13, p. 227]].

specie redox e a misurare una corrente. Per valori del potenziale in modulo crescenti la corrente aumenta ulteriormente, raggiunge un massimo (Figura 2.2, picco di corrente di riduzione P) e infine decresce. Facciamo alcune considerazioni:

- la Figura 2.2 mostra, correttamente, valori di corrente non nulli già prima di  $E^0$ . Questo è dovuto al fatto che sebbene la riduzione sia indotta in corrispondenza di  $E^0$  è comunque presente una componente di corrente non faradica, associabile alla capacità con cui viene modellizzata l'interfaccia elettrodo-soluzione. Questo argomento viene ripreso e discusso in dettaglio in sezione 2.3.1;
- la spiegazione del picco P va cercata nella natura del sistema. Al crescere in modulo della tensione cresce anche il tasso di trasferimento elettronico all'interfaccia

soluzione-elettrodo. Si arriva a un punto in cui la velocità di diffusione di reagenti dal bulk della soluzione verso l'elettrodo non riesce a tenere il passo con la velocità di trasferimento di carica così che il fattore limitante della velocità del processo (il *controllo cinetico* del processo) passa dal trasferimento di carica al trasferimento di materia tra soluzione ed elettrodo. Detto altrimenti, prima del picco P il processo è limitato dal tasso di trasferimento elettronico; in corrispondenza del picco la velocità di diffusione è perfettamente in equilibrio con la velocità di trasferimento elettronico del processo redox, e i reagenti che affluiscono alla superficie dell'elettrodo reagiscono tutti e immediatamente, senza tempi di latenza. Superato il picco si entra nella regione cosiddetta di *controllo diffusivo* del processo e la corrente necessariamente cala: col procedere dell'elettrolisi infatti cresce lo spessore della zona impoverita di reagente intorno all'elettrodo e i nuovi reagenti devono coprire per diffusione distanze sempre maggiori.

Va sottolineato che è proprio la presenza del picco, a valori di potenziale caratteristici di ciascuna specie redox, a consentire la rilevazione a posteriori di tale sostanza in soluzione. È anche possibile che più sostanze, copresenti in soluzione, mostrino picchi per valori simili di potenziale e di conseguenza portino contributi di corrente che vanno a sommarsi. In questo contesto il picco di una delle specie redox può sparire, mascherato dalle altre; si usa dire che le seconde agiscono da *interferenti* rispetto alla prima.

Tornando alla teoria, il comportamento descritto riguardava l'evoluzione del sistema in risposta alla prima rampa di potenziale (primo semiperiodo del segnale di comando). Nel momento in cui la pendenza della rampa viene invertita (secondo semiperiodo) lo stato del sistema è in generale il seguente: la specie ridotta, generata durante il primo semiperiodo, è presente prevalentemente nelle vicinanze dell'elettrodo; nel bulk della soluzione abbonda invece la specie ossidata dal momento che solo una frazione di essa ha preso parte al precedente processo di riduzione. La prima è ora disponibile per essere nuovamente ossidata. Il fatto che venga tutta o meno ossidata dipenderà poi da più fattori, in particolare la cinetica del processo di ossidazione, la diffusione di parte della specie ridotta verso il bulk della soluzione (che così facendo si sottrae al processo di ossidazione) o la conversione di parte della specie ridotta in altre specie molecolari a causa di reazioni chimiche non redox che possano intercorrere in soluzione.

La forma registrata per il segnale di corrente durante questo secondo semiperiodo ricalca concettualmente quella descritta, solo di valore opposto trattandosi ora di una corrente anodica anziché catodica, ed è spiegabile con le stesse argomentazioni sopra riportate. Il picco di ossidazione è indicato con la lettera Q in Figura 2.2.

Motiviamo infine la presenza, nel segnale di comando, del transitorio iniziale a potenziale costante individuato dal parametro Quiet time. Questo transitorio non è necessario ma può essere utile: ad esempio, qualora si desideri che in soluzione siano presenti entrambe le specie ossidata e ridotta prima dell'inizio della misura, e supponendo assente la prima, è possibile applicare un potenziale ossidante per un intervallo di tempo sufficiente (coerentemente con la cinetica di ossidazione).

Terminiamo questa breve introduzione con una considerazione sulla corrente. Dal momento che in un'indagine ciclovoltammetrica la tensione applicata viene variata, risulta necessariamente presente una corrente non faradica  $i_c$  di carica della capacità associata all'interfaccia elettrodo-soluzione. Ricordiamo la semplice relazione tra tensione e modulo della corrente in un condensatore di area  $A$  e capacità per unità di area  $C_d$ :

$$(2.2) \quad |i_c| = AC_d \left| \frac{dV}{dt} \right|$$

dove l'esigenza di considerare il modulo della corrente nasce dalla volontà di generalizzare il concetto indipendentemente dalla convezione scelta (polarografica o IUPAC). Per la relazione (2.1) quest'ultima uguaglianza si traduce in:

$$(2.3) \quad |i_c| \stackrel{2.1}{=} AC_d \cdot \nu$$

ed essendo il valore di  $\nu$  costante se ne ricava che in ogni traccia ciclovoltammetrica è presente una corrente di fondo, non faradica e costante, tipicamente secondaria rispetto agli scopi della misura. Tale corrente è riferita in letteratura coi nomi di *background current* o *baseline current*. Indicando con  $i_p$  la corrente di picco (di ossidazione o riduzione) sottratto il contributo di fondo  $i_c$ , vale la relazione:

$$(2.4) \quad \frac{|i_c|}{i_p} = \frac{C_d}{2.69 \cdot 10^5 n C_0} \sqrt{\frac{\nu}{nD}}$$

dove  $D$  è la diffusività della specie redox,  $C_0$  la sua concentrazione nel bulk della soluzione ed  $n$  il numero di elettroni che ciascuna molecola della specie redox scambia agli elettrodi. Possiamo riscrivere la (2.4) come:

$$(2.5) \quad i_p \stackrel{2.4}{=} 2.69 \cdot 10^5 \frac{n C_0 |i_c|}{C_d} \sqrt{\frac{nD}{\nu}} \stackrel{2.3}{=} 2.69 \cdot 10^5 A n C_0 \sqrt{nD \nu}$$

Il confronto tra le relazioni (2.3) e (2.5) consente di vedere che  $i_c \propto \nu$  mentre  $i_p \propto \frac{1}{\sqrt{\nu}}$ , pertanto al crescere del valore di scan rate tende a dominare la componente non faradica della corrente misurata.

A tutto questo va sommato un ulteriore contributo di corrente non faradica dovuto alla resistenza di conduzione non nulla della soluzione. Essendo che in ciclovoltammetria la tensione è variata linearmente (Figura 2.1) ne consegue per la legge di Ohm un andamento lineare della corrente di conduzione in soluzione. Riassumendo quindi la corrente di fondo si comporrà di due termini, uno costante e uno lineare in tensione; la corrente faradica di picco pertanto viene misurata non dall'ordinata zero bensì a partire dal valore della corrente di fondo, quest'ultimo individuabile graficamente grazie al citato andamento rettilineo (Figura 2.3). Va sottolineato tuttavia che stante la costanza delle condizioni al contorno (stato fisico dell'elettrodo, scan rate, soluzione, posizione in tensione del picco) le componenti non faradiche, al bisogno, possono essere assimilate a costanti del sistema. Questa nota è essenziale per la corretta comprensione dei dati presentati nei capitoli 4 e 5, dove i valori di corrente che compariranno nei grafici saranno tutti misurati dall'ordinata zero. Affermare, in quel contesto, che le componenti non faradiche siano costanti sarà un'utile ipotesi, vera solo in prima approssimazione: almeno la soluzione, e spesso la posizione in tensione del picco, non saranno costanti. Il fatto è che nel nostro lavoro, come risulterà chiaro più avanti, non siamo interessati tanto a validare un sensore già pronto per il mercato quanto a determinarne la capacità di rilevare una sostanza di interesse. In funzione di questo scopo il nostro interesse si sposta dai valori esatti di corrente faradica (per i quali è necessario misurare dal valore di corrente di fondo) alla capacità del dispositivo di presentare picchi distinguibili (per la quale è sufficiente misurare da ordinata nulla).

### 2.1.2 Sistemi reversibili

In questa e nella prossima sezione ci proponiamo di fornire una descrizione quantitativa delle grandezze direttamente misurabili attraverso una ciclovoltammetria, in particolare i valori di corrente di picco e i potenziali associati a tali picchi. La trattazione sarà condotta

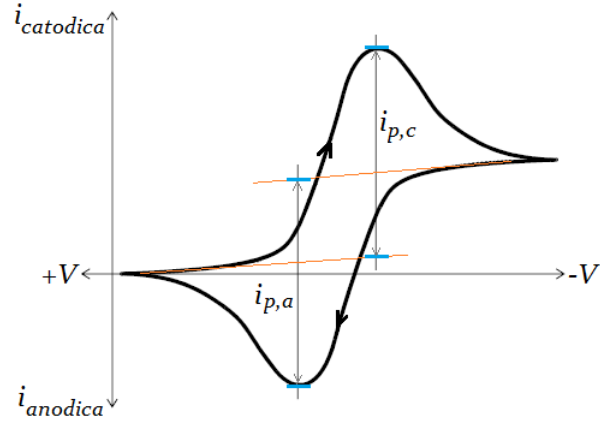


Figura 2.3: Estrazione della corrente di fondo dalla traccia ciclovoltammetrica. In rosso le tracce che definisce la corrente di fondo; il fatto che siano apparentemente parallele è un caso e non va assunto a regola generale. Sono evidenziate, tra segmenti blu, le componenti faradiche dei picchi di corrente catodica  $i_{p,c}$  e anodica  $i_{p,a}$ .

separatamente sulla base del grado di reversibilità del sistema, concetto introdotto in sezione 1.2.3.

In questa prima sezione consideriamo il caso di sistema reversibile, per il quale il processo di trasferimento elettronico è molto rapido e il controllo cinetico del processo è dato dalla velocità di diffusione della specie redox da e verso l'elettrodo. Si può dimostrare che valgono le seguenti relazioni, a partire dall'espressione della corrente di picco  $i_p$ :

$$(2.6) \quad i_p = 0.4463nAC_0\sqrt{\frac{F^3nD\nu}{RT}}$$

dove al solito  $A$  è l'area dell'elettrodo interessata da scambio di carica,  $D$  è la diffusività della specie redox,  $C_0$  la sua concentrazione nel bulk della soluzione ed  $n$  il numero di elettroni che ciascuna molecola della specie redox scambia agli elettrodi.  $F$  è la costante di Faraday,  $R$  la costante universale dei gas,  $T$  la temperatura;  $\nu$  è il valore di scan rate. In particolare per  $T = 25^\circ\text{C}$  la relazione (2.6) si semplifica in:

$$(2.7) \quad i_p \stackrel{2.6}{=} 2.69 \cdot 10^5 nAC_0\sqrt{nD\nu}$$

Di queste due relazioni va sottolineata in particolare la proporzionalità diretta di  $i_p$  rispetto a  $\sqrt{\nu}$ ; ci proponiamo ora di darne una giustificazione. La corrente misurata all'elettrodo è legata al flusso di materia che reagisce alla superficie dell'elettrodo, e per valori prossimi a  $E_p$  tale flusso è controllato dal tasso di diffusione della specie elettroattiva. La prima legge di Fick (1.28) ci informa che la corrente riflette il gradiente di concentrazione della specie redox vicino all'elettrodo, il quale è controllato a sua volta dallo spessore dello strato (layer) di diffusione. Se il valore di scan rate cresce si dà meno tempo al processo di elettrolisi per agire riducendo pertanto lo spessore della regione svuotata di reagente intorno all'elettrodo; ne consegue un layer di diffusione più sottile e quindi un gradiente di concentrazione maggiore, da cui una maggiore corrente. Dualmente si può giustificare il fatto che per valori calanti di  $\nu$  le curve tendano ad appiattirsi.

Una seconda, importante proprietà delle correnti faradiche nei sistemi reversibili è l'uguaglianza in modulo dei picchi di corrente anodica  $i_{p,a}$  e catodica  $i_{p,c}$ , così che vale il

rapporto:

$$(2.8) \quad \frac{i_{p,a}}{i_{p,c}} = 1$$

con l'unica ipotesi che la pendenza del potenziale in ingresso al sistema non venga invertita per valori di potenziale troppo vicini a quello associato al picco (si chiede una separazione in ascissa di almeno  $\frac{35}{n}$  mV).

Definendo ora  $E_p$  come il valore di potenziale associato al picco  $i_p$  e  $E_{p/2}$  come il valore di potenziale associato a  $0.5i_p$ , vale la relazione:

$$(2.9) \quad |E_p - E_{p/2}| = 2.20 \frac{RT}{nF}$$

che per  $T = 25^\circ\text{C}$  si semplifica in:

$$(2.10) \quad |E_p - E_{p/2}| = \frac{56.5}{n} \text{mV}$$

Si noti come  $E_p$  non dipenda dal valore di scan rate impiegato durante la misura. La relazione (2.10) assume particolare utilità in due casi:

- confermare la natura reversibile del processo elettrochimico in esame;
- individuare con più precisione il valore di  $E_p$  qualora tale operazione vada eseguita a mano su una traccia stampata; questo perché  $E_{p/2}$  cade spesso su un tratto a maggior pendenza della curva ciclovoltammetrica e pertanto è individuabile con maggior precisione rispetto a  $E_p$ .

Una seconda relazione, anch'essa di utilità diagnostica per confermare la natura reversibile del processo, è quella che definisce la differenza tra i valori di tensione  $E_{p,a}$  ed  $E_{p,c}$  associati rispettivamente ai picchi anodico e catodico. Tale relazione afferma che:

$$(2.11) \quad |E_{p,a} - E_{p,c}| = 2.3 \frac{RT}{nF}$$

pari a circa  $\frac{58}{n}$  mV per  $T = 25^\circ\text{C}$ . Vale inoltre che il potenziale di riduzione  $E^0$  è dato dalla media aritmetica dei due valori di picco:

$$(2.12) \quad E^0 = \frac{E_{p,a} + E_{p,c}}{2}$$

e dista pertanto  $\frac{29}{n}$  mV da ciascun picco per  $T = 25^\circ\text{C}$ .

### 2.1.3 Sistemi irreversibili

In questa sezione trattiamo brevemente il caso di sistema irreversibile, per il quale il processo di trasferimento elettronico costituisce il controllo cinetico dell'intero processo. In questa ipotesi, come introdotto in sezione 1.2.3, la corrente di scambio agli elettrodi è piccola ed è richiesto un sovrapotenziale  $\eta$  maggiore rispetto al caso reversibile per indurre una corrente sensibile nel sistema. Introduciamo qui le formule descrittive di questa tipologia di sistema, a partire dall'espressione della corrente di picco che si può dimostrare essere:

$$(2.13) \quad i_p = 2.99 \cdot 10^5 AC_0 \sqrt{\alpha D \nu}$$



dove  $\alpha$  è il coefficiente anodico di trasferimento di carica già introdotto nell'equazione di Butler-Volmer (1.24). Si può osservare anche in questo caso la dipendenza da  $\sqrt{\nu}$  già osservata nel caso reversibile. I potenziali  $E_p$  ed  $E_{p/2}$  invece sono legati dalla relazione:

$$(2.14) \quad |E_p - E_{p/2}| = 1.857 \frac{RT}{\alpha F}$$

che per  $T = 25^\circ\text{C}$  si riduce a:

$$(2.15) \quad |E_p - E_{p/2}| = \frac{47.7}{\alpha} \text{mV}$$

Va sottolineato che, rispetto al caso reversibile,  $E_p$  non è costante ma varia con  $\nu$ , traslando (nel caso del picco di riduzione) verso valori più negativi al crescere del valore di scan rate. Più nel dettaglio se  $\nu$  cresce di un ordine di grandezza  $E_p$  trasla di un termine pari a  $1.15RT/(\alpha F)$ , pari a  $30/\alpha$  mV per  $T = 25^\circ\text{C}$ .

## 2.2 Spettroscopia d'impedenza elettrochimica

In questo Capitolo presentiamo il metodo di analisi che prende il nome di spettroscopia d'impedenza elettrochimica (EIS), centrale nelle misure e nelle analisi svolte nella presente Tesi. Verranno introdotti la tecnica di misura, il software di analisi impiegato e una breve panoramica dei casi elementari, preliminari alla discussione delle misure effettivamente svolte e riportate nel Capitolo 4.

### 2.2.1 Tecnica di misura

La spettroscopia d'impedenza elettrochimica è una tecnica non distruttiva che studia le proprietà dei materiali e dei processi che interessano l'interfaccia elettrodo-soluzione di un sistema elettrochimico. Si tratta inoltre di una tecnica molto valida per valutare lo stato fisico di una interfaccia e la sua eventuale degradazione nel tempo. La base della tecnica consiste in una misura in frequenza (da cui la parola *spettroscopia*) di un segnale AC di corrente conseguente ad un segnale AC di tensione applicato alla cella elettrochimica. In cella può essere disciolta una specie redox definita *mediatore*: essa scambia elettroni agli elettrodi e trasporta la carica in soluzione, abbassando quindi la resistività della soluzione e agevolando la rilevazione del segnale di corrente. Il risultato numerico fornito dalla misura per ogni valore di pulsazione  $\omega$  del segnale d'ingresso è banalmente il rapporto dei fasori, ovvero l'*impedenza*. Presentiamo qui brevemente i richiami di teoria relativi ai concetti introdotti.

Data una grandezza variabile sinusoidalmente nel tempo:

$$(2.16) \quad x(t) = A \cos(\omega t + \phi)$$

definiamo fasore la sua trasformata di Steinmetz:

$$(2.17) \quad X = A e^{j\phi}$$

dove, stante la formula di Eulero:

$$(2.18) \quad e^{jx} = \cos x + j \sin x$$

si vede che l'operazione di antitrasformazione è semplicemente:

$$(2.19) \quad x(t) = \text{Re}(X e^{j\omega t})$$

Nella definizione di fasore si perde l'informazione sulla pulsazione; la tecnica di analisi delle reti lineari mediante fasori è pertanto applicabile solo a reti al cui interno i segnali siano isofrequenziali. Considerando ora i segnali di tensione e corrente:

$$(2.20) \quad \begin{cases} v(t) = V_M \cos(\omega t + \phi_v) \\ i(t) = I_M \cos(\omega t + \phi_i) \end{cases}$$

e i fasori associati:

$$(2.21) \quad \begin{cases} V = V_M e^{j\phi_v} \\ I = I_M e^{j\phi_i} \end{cases}$$

definiamo impedenza il rapporto:

$$(2.22) \quad Z = \frac{V}{I} = \frac{V_M}{I_M} e^{j(\phi_v - \phi_i)}$$

e ricordiamo che, in quanto numero complesso,  $Z$  può sempre essere scritto in forma trigonometrica:

$$(2.23) \quad Z = |Z| e^{j\phi_z} \quad \text{con} \quad \begin{cases} |Z| \stackrel{2.22}{=} \frac{V_M}{I_M} \\ \phi_z \stackrel{2.22}{=} \phi_v - \phi_i \end{cases}$$

Parte reale e immaginaria sono quindi rispettivamente:

$$(2.24) \quad \begin{cases} \text{Re}(Z) \stackrel{2.18}{=} |Z| \cos \phi_z \\ \text{Im}(Z) \stackrel{2.18}{=} |Z| \sin \phi_z \end{cases}$$

ed esprimono le componenti rispettivamente resistiva e capacitiva/induttiva di  $Z$  (capacitiva se  $\text{Im}(Z) < 0$ , induttiva altrimenti).

Ricordiamo anche che l'impedenza, vista come funzione di trasferimento (cioè, per definizione, come rapporto tra i segnali di uscita e di ingresso in un sistema lineare), è adatta a descrivere una misura nella quale si applichi una corrente per poi leggere in uscita al sistema una tensione. Nel caso opposto sarebbe più corretto lavorare con l'inverso  $Y = 1/Z$  ovvero con l'*ammettenza*, per quanto in spettroscopia sia comune fare uso delle impedenze.

Facciamo ora alcune considerazioni sui sistemi elettrochimici. Un sistema elettrochimico è intrinsecamente non lineare, e questo come conseguenza della varietà di processi che la interessano: processi fisici (come la diffusione di sostanze in soluzione), scambi elettronici, reazioni chimiche, alterazioni tempo-dipendenti della superficie dell'elettrodo. Questo impedisce l'applicazione dei fasori allo studio del sistema; si rende pertanto necessario linearizzare il sistema attorno a un punto di lavoro:

- il punto di lavoro (*bias*) è determinato imponendo un valore DC di tensione in ingresso al sistema. La scelta di tale valore dipende dal sistema in esame; ad esempio può essere il potenziale redox standard della specie redox impiegata come mediatore in soluzione, così da favorirne i processi di trasferimento elettronico agli elettrodi;

- il segnale AC è applicato in regime di piccolo segnale, ovvero per valori di ampiezza sufficientemente piccoli affinché la risposta del sistema sia considerabile lineare. In termini pratici questo si traduce nell'usare segnali AC di tensione di ampiezza non superiore a 10 mV; per le nostre misure abbiamo imposto al segnale un'ampiezza pari a 5 mV.

Altre condizioni da verificare per poter svolgere una misura spettroscopica sono garantire:

- l'elettroneutralità della soluzione elettrolitica, per non introdurre campi elettrici indesiderati o fenomeni di trasporto per deriva elettrica;
- la mancanza di fenomeni convettivi in soluzione;
- la costanza delle condizioni al contorno: temperatura, concentrazione del mediatore in soluzione, pH, bias applicato. Per fare un esempio pratico, nel caso in cui la soluzione impiegata nel test sia esposta all'aria e di volume ridotto è possibile che una parziale evaporazione del solvente durante la misura alteri la concentrazione del mediatore;
- garantire che la risposta registrata sia funzione del sistema e non della durata temporale del test.

Riguardo all'ultimo punto va detto che, per effettuare la misura di impedenza, l'apparato di misura tipicamente media sui valori registrati lungo un certo numero di periodi del segnale di tensione in ingresso. Impostare un numero diverso di periodi determina una diversa durata temporale del test.

## 2.3 Interfaccia soluzione-elettrodo

### 2.3.1 Modello fisico

In questa sezione viene approfondita la struttura dell'interfase tra elettrodo metallico e soluzione elettrolitica. La modellizzazione proposta è stata complicata negli anni per meglio descrivere le osservazioni sperimentali e viene qui ripercorsa.

Partiamo dalla osservazione anticipata nel Capitolo 1.2.1: un elettrodo metallico inserito in una soluzione tende a caricarsi elettricamente. Ciò può essere dovuto ad una reazione di ossidoriduzione spontanea, che per semplicità possiamo considerare meccanismo dominante rispetto ad altri possibili (come l'adsorbimento di ioni dalla soluzione). Giunta la reazione all'equilibrio, si sarà ottenuto un trasferimento netto di carica tra elettrodo e soluzione; questo determina una differenza di potenziale tra i due e l'instaurarsi di un campo elettrico. Questi ultimi passaggi saranno familiari al lettore dai corsi di microelettronica. Una nota: formalmente la modellizzazione viene fatta nell'ipotesi che non siano attivi processi faradici; di fatto, abbiamo fatto ricorso a un processo faradico (la reazione di ossidoriduzione) solo per motivare la presenza della carica sull'elettrodo e possiamo da qui dimenticarcelo e ragionare nel contesto di un elettrodo carico inserito in una soluzione elettrolitica.

Il primo modello, ad opera di Helmholtz e Perrin, prevedeva che la densità di carica superficiale  $q_m$  sull'elettrodo venisse bilanciata all'interfaccia da una densità di carica  $-q_s$  pari e opposta dovuta ai contro-ioni solvatati dell'elettrolita disciolto. A questi si aggiunge un monolayer di spessore  $d_a$  costituito da molecole polari opportunamente orientate (prima fra tutte l'acqua) a diretto contatto con la superficie dell'elettrodo. Questo processo è puramente elettrostatico e genera nella zona di interfaccia un accumulo di ioni solvatati,

il cui segno dipende da quello della carica accumulata all'elettrodo, i quali non potranno avvicinarsi all'elettrodo oltre la minima distanza di approccio  $d = r + d_a$  fissata dal raggio idrodinamico  $r$ . Il piano passante per il centro di questi ioni è detto *piano esterno di Helmholtz* (OHP - Outer Helmholtz Plane). La Figura 2.4 riassume questi concetti.

Nel complesso il modello di Helmholtz prevede che la caduta di potenziale si esaurisca

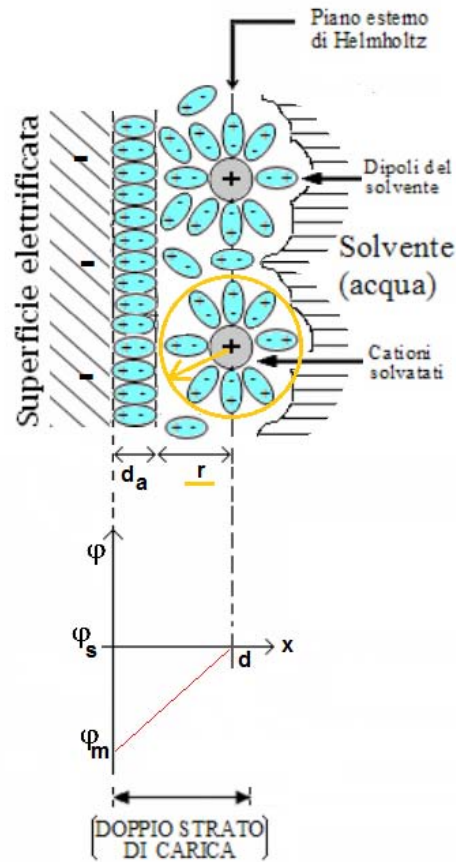


Figura 2.4: Modello DL dell'interfaccia soluzione-elettrodo. In arancione sono indicati il raggio idrodinamico e la sfera di solvatazione [fonte: rielaborazione di immagine prelevata dalla fonte 5. in Sitografia. Diritti intellettuali e di copyright sull'immagine: Dott. Federico Carpi e Dott. Danilo De Rossi].

al piano esterno di Helmholtz, il quale raccoglie una carica complessiva pari e opposta a quella sull'elettrodo. Queste due superfici piane, parallele e ugualmente cariche in modulo, costituiscono il *doppio strato elettrico* di Helmholtz (DL - Double Layer) da cui questo modello prende il nome. Il profilo di potenziale è lineare a meno della piccola deviazione dalla idealità introdotta dal monolayer polare di spessore  $d_a$ .

Il modello di Helmholtz è stato ripreso e ampliato da Gouy e Chapman, i quali hanno osservato che l'attrazione elettrostatica non è l'unica forza in gioco ma deve essere sommata al moto browniano degli ioni in soluzione; questo allontana gli ioni dall'interfaccia dell'elettrodo, disperdendoli all'interno di un *layer di diffusione* detto anche *doppio strato diffuso*. La caduta di potenziale interessa quindi una regione più estesa del piano esterno di Helmholtz e perde l'andamento lineare tipico della configurazione a facce piane parallele.

Il modello di Gouy e Chapman considerava gli ioni come cariche puntiformi. Stern ha successivamente riconsiderato gli ioni come entità di dimensione finita, recuperando l'idea di Helmholtz di minima distanza di approccio e introducendo un modello che comprende sia il piano esterno sia il layer di diffusione. In questo contesto il profilo di potenziale è

lineare solo nella regione compresa tra elettrodo e piano esterno mentre assume nel layer di diffusione l'andamento previsto dal modello di Gouy e Chapman. Graham infine ha integrato il modello di Stern prendendo in considerazione la possibilità di adsorbimento di specifici corpi (soprattutto ioni) alla superficie dell'elettrodo. Parliamo di processi di adsorbimento successivi alla creazione del doppio strato, in accordo con l'ipotesi che faceva delle reazioni redox spontanee il meccanismo all'origine della carica sull'elettrodo. In questo scenario lo ione perde parte del guscio di solvatazione e si lega all'elettrodo, superando il limite di minima distanza imposto dal piano esterno. Per questo motivo viene definito un *piano interno di Helmholtz* (IHP - Inner Helmholtz Plane) passante per il centro delle specie adsorbite e il modello prende il nome di *modello a tre strati*. Il profilo di potenziale si modifica in accordo all'equazione di Poisson per l'elettrostatica. La Figura 2.5 riassume questi concetti.

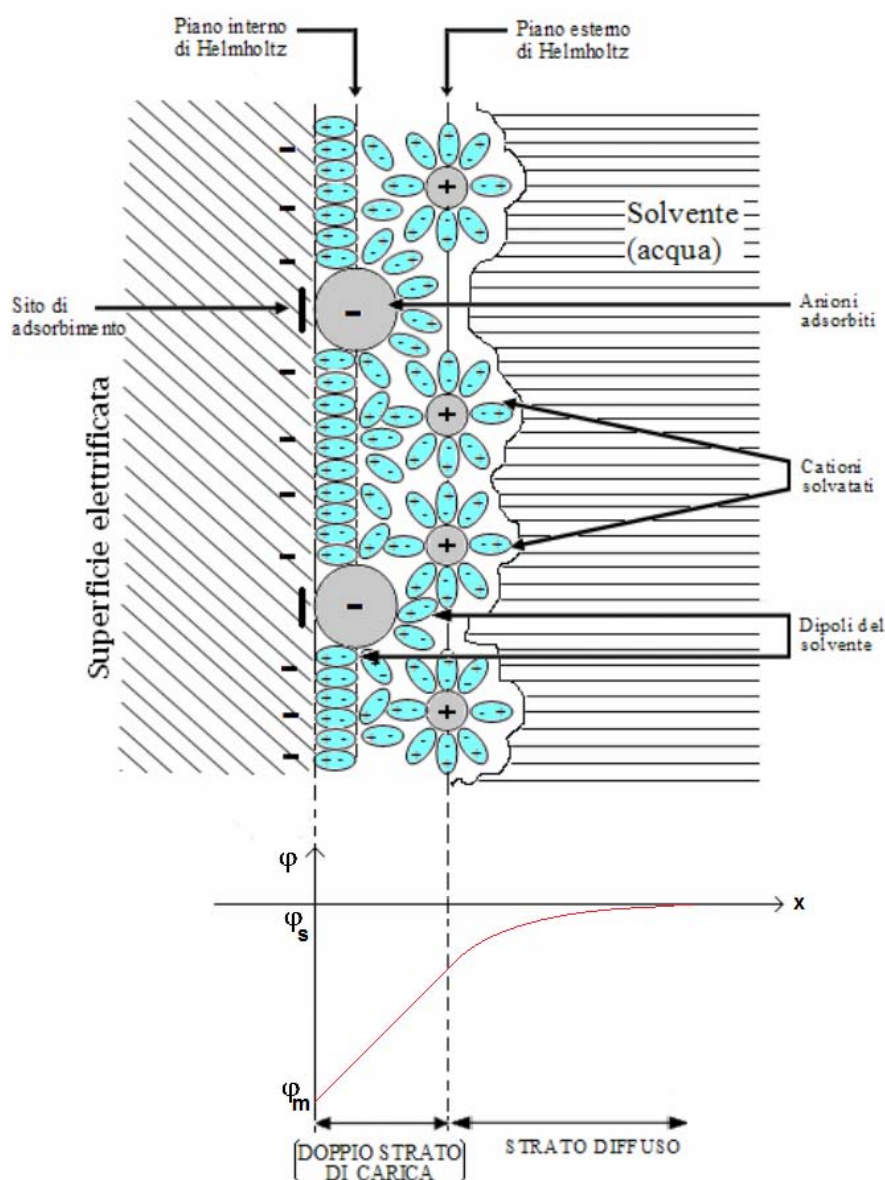


Figura 2.5: Modello di Graham dell'interfaccia soluzione-elettrodo. [fonte: rielaborazione di immagine prelevata dalla fonte 5. in Sitografia. Diritti intellettuali e di copyright sull'immagine: Dott. Federico Carpi e Dott. Danilo De Rossi].

## 2.3.2 Modello elettrico

Come spesso accade in ambito elettrico/elettronico, sistemi fisici complessi possono essere modellizzati con circuiti diversi a seconda del grado di precisione che si vuole raggiungere. Il modello basilare che introduciamo in questa sezione prende il nome di *circuito equivalente di Randles* e si propone di dare una prima descrizione della cella elettrochimica nel suo complesso. Altri modelli saranno presi in considerazione nel Capitolo 4.

### 2.3.2.1 Cella minima e cella di Randles

Ricordiamo innanzitutto che per un corpo dotato di carica  $q$  si definisce la sua capacità differenziale come:

$$(2.25) \quad C = \frac{\partial q}{\partial \Delta \phi_{ms}}$$

Ora, il modello di Helmholtz a doppio strato introdotto in sezione 2.3.1 prevede che la superficie dell'elettrodo e il piano esterno di Helmholtz costituiscano due superfici piane parallele con carica uguale in modulo: esattamente la struttura che definisce un condensatore a facce (armature) piane parallele. In questo contesto la relazione (2.25) coincide con:

$$(2.26) \quad C_{par} = \frac{\varepsilon A}{d}$$

dove  $A$  è l'area di ciascuna delle due armature,  $\varepsilon$  la costante dielettrica del mezzo interposto e  $d$  al solito è la distanza tra di esse cioè tra elettrodo e piano esterno di Helmholtz. Si osservi che formalmente il piano esterno circonda l'elettrodo e se quest'ultimo è circolare (condizione tipica dei macroelettrodi) il modello più appropriato sarebbe quello del condensatore cilindrico; tuttavia la distanza tra le due armature è a tal punto piccola che il condensatore può dirsi localmente a facce parallele ovunque lungo il bordo dell'elettrodo. Un problema meno trascurabile consiste invece nel fatto che  $C$  varia col potenziale applicato.

Questo succede perché il modello su cui si basa l'equazione (2.26) non tiene conto del layer di diffusione. Tenerne conto tuttavia comporta un certo complicarsi delle relazioni matematiche. La soluzione formale al problema è stata presentata da Gouy e Chapman, i quali hanno mostrato che la carica  $q_d$  nel layer diffuso si distribuisce in modo molto simile a un insieme di ioni negativi attorno ad uno ione positivo. Applicando la statistica di Maxwell-Boltzmann essi hanno ricavato che:

$$(2.27) \quad q_d = \left( \frac{2k_B T n_0 \varepsilon}{\pi} \right)^{1/2} \sinh \left( \frac{q \Delta \phi_{ms}}{2k_B T} \right)$$

dove  $n_0$  è il numero di ioni positivi e negativi per unità di volume nel bulk della soluzione e  $q$  il quanto elementare di carica. Da questa, applicando l'equazione (2.25), si ricava:

$$(2.28) \quad C_{diffuse} = \left( \frac{n_0 \varepsilon e^2}{2\pi k_B T} \right)^{1/2} \cosh \left( \frac{q \Delta \phi_{ms}}{2k_B T} \right)$$

Modelli analitici ancora più complessi sono stati presentati in anni successivi man mano che il modello dell'interfaccia soluzione-elettrodo veniva complicato ad opera di Stern e Graham. Qualitativamente la modellizzazione è molto intuitiva: si tratta di associare ad ogni strato (tre, nel caso del modello di Graham) un valore di capacità e poi farne

l'equivalente serie ovvero:

$$(2.29) \quad C_{serie,Ci} = \left( \sum_i \frac{1}{C_i} \right)^{-1} \triangleq C_d$$

Individuare le relazioni analitiche che descrivono il valore di queste capacità è invece un problema ben più serio (in cui non ci addentreremo), complicato dal fatto che le condizioni al contorno possono non essere costanti nel tempo; ad esempio, nulla garantisce che le molecole adsorbite nell'IHP non possano essere desorbite in un secondo momento. Questo può portare a modificare la (2.29) con l'introduzione di pesi opportuni.

Tornando al modello generale, possiamo osservare come il funzionamento tipico di un elettrodo preveda che esso si possa caricare ma al tempo stesso possa scambiare carica con la soluzione. Il modello elettrico che meglio descrive la coesistenza di questi due fenomeni è il parallelo di  $C_d$  (spesso indicata come *capacità di double layer*) con una resistenza  $R$  (Figura 2.6). Modelli più complessi possono sostituire la capacità  $C_d$  con

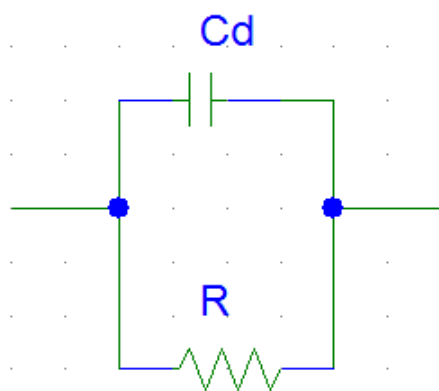


Figura 2.6: Modello elettrico minimo dell'interfaccia soluzione-elettrodo.

un elemento a fase costante (argomento ripreso in sezione 2.3.2.3) e la resistenza  $R$  con una *impedenza faradica*  $Z$  qualora si voglia tenere in considerazione il comportamento in frequenza dell'elettrodo. I contributi che concorrono a formare l'impedenza faradica  $Z$  sono:

- la *resistenza di trasferimento di carica (charge-transfer resistance)*  $R_{ct}$  che modella il processo con cui gli elettroni vengono scambiati all'interfaccia soluzione-elettrodo; si tratta di una resistenza non lineare, inversamente proporzionale alla corrente che attraversa l'elettrodo, e può essere ulteriormente suddivisa in contributi derivanti dai singoli step con cui il trasferimento si attua;
- l'*impedenza di Warburg*, discussa nel dettaglio in sezione 2.3.2.2.

Infine è possibile mettere in serie a questa rete una resistenza  $R_{sol}$  che modella le cadute di potenziale attraverso la soluzione. In Figura 2.7 viene presentato il modello elettrico riassuntivo dei concetti esposti.

### 2.3.2.2 Elemento di Warburg

L'elemento di Warburg modella la diffusione in un sistema elettrochimico al quale sia applicato un segnale sinusoidale di tensione di piccola ampiezza (dell'ordine dei millivolt) e pulsazione  $\omega = 2\pi f$ . Il risultato di questa modellizzazione, descritta nel dettaglio in

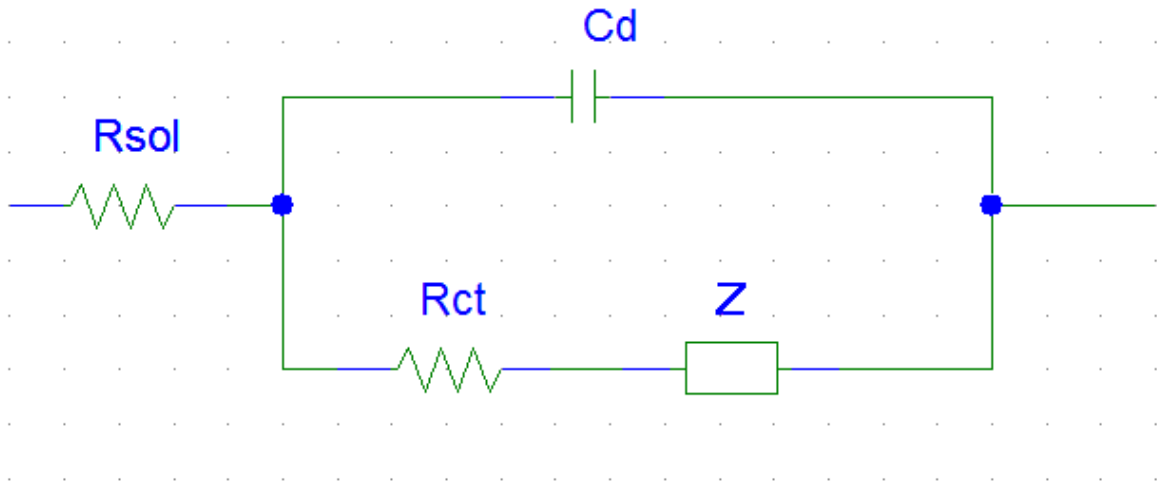


Figura 2.7: Circuito equivalente di Randles.

Appendice B, è la cosiddetta *impedenza di diffusione* o *di Warburg*; essa presenta espressioni diverse a seconda delle condizioni al contorno del sistema, ma in generale mostra un andamento proporzionale all'inverso della radice quadrata della frequenza. Presentiamo ora i risultati relativi ai casi di interesse.

### Impedenza di diffusione in un mezzo semi-infinito

Si consideri un sistema elettrochimico contenente una specie redox libera di diffondere in un mezzo non delimitato (semi-infinito), o comunque tale che la diffusione sia dominata da una sola tra più specie compresenti.

In questo contesto l'impedenza di Warburg vale:

$$(2.30) \quad Z(j\omega) = \frac{RT}{(nF)^2 c_0 A \sqrt{2D}} (1 - j)$$

dove  $R$  è la costante universale dei gas ed  $F$  la costante di Farady,  $T$  la temperatura assoluta,  $n$  il numero di elettroni scambiati dalla ciascuna molecola della specie redox all'elettrodo,  $c_0$  la concentrazione della specie redox all'elettrodo al tempo zero (pari a quella nel bulk, per sistema inizialmente a riposo),  $A$  l'area attiva dell'elettrodo,  $D$  la diffusività della specie redox. Chiamando:

$$(2.31) \quad Z_W \triangleq \frac{RT}{(nF)^2 c_0 A \sqrt{2D}} > 0$$

possiamo riscrivere la (2.30) come:

$$(2.32) \quad Z(j\omega) \stackrel{2.30}{=} \stackrel{2.31}{\left( \frac{Z_W}{\sqrt{\omega}} - j \frac{Z_W}{\sqrt{\omega}} \right)} = \frac{Z_W}{\sqrt{\omega}} (1 - j)$$

avente modulo e fase pari rispettivamente a:

$$(2.33) \quad |Z(j\omega)| = \sqrt{2} \frac{Z_W}{\sqrt{\omega}}$$

$$(2.34) \quad \angle Z(j\omega) \equiv \angle(1 - j) = -45^\circ$$



Si dimostra in Appendice B che la relazione 2.32 equivale a:

$$(2.35) \quad Z(jw) = \sqrt{2} \frac{Z_W}{\sqrt{jw}}$$

Va osservato che in alta frequenza l'impedenza di Warburg diventa trascurabile.

### Impedenza di diffusione in un mezzo di spessore finito

In molti casi lo spessore del mezzo interessato dal fenomeno diffusivo è finito. Detto  $L$  tale spessore si individuano due casi limite di interesse, determinati dalle condizioni al contorno del sistema:

1. alla distanza  $x = L$  non vi sono barriere al trasferimento di specie redox (elettroattive). Questo caso è definito di *diffusione finita trasmissiva* o *conduttiva* (*open o transmissive boundary finite-length diffusion* in letteratura scientifica) ed è descritta dal cosiddetto *elemento Warburg short*.
2. alla distanza  $x = L$  non è possibile alcun trasferimento di specie elettroattive. Si parla in questo caso di *diffusione finita riflessiva* (*blocking o reflecting boundary finite-length diffusion*) descritta dall'*elemento Warburg open*.

Riportiamo di seguito l'espressione matematica di questi due elementi. Nel caso di diffusione trasmissiva vale che:

$$(2.36) \quad Z_s(jw) = \frac{\sqrt{2}Z_W}{\sqrt{jw}} \tanh\left(\sqrt{\frac{jw}{D}}L\right)$$

Definendo inoltre per nostra comodità:

$$(2.37) \quad w_1 = \frac{wL^2}{D}$$

possiamo riscrivere la (2.36) come:

$$(2.38) \quad Z_s(jw_1) \stackrel{2.36}{=} \stackrel{2.37}{=} Z_W L \sqrt{\frac{2}{D}} \frac{1}{\sqrt{jw_1}} \tanh(\sqrt{jw_1})$$

Questa espressione tornerà utile nel seguito. Da essa si ricava che l'elemento Warburg short si comporta come una resistenza in bassa frequenza e come un elemento Warburg semplice in alta frequenza (si veda l'Appendice B per i dettagli).

Per quanto riguarda il caso di diffusione riflessiva vale che:

$$(2.39) \quad Z_o(jw) = \frac{\sqrt{2}Z_W}{\sqrt{jw}} \coth\left(\sqrt{\frac{jw}{D}}L\right)$$

che facendo uso della (2.37) può essere riscritta come:

$$(2.40) \quad Z_o(jw) \stackrel{2.37}{=} \stackrel{2.39}{=} Z_W L \sqrt{\frac{2}{D}} \frac{1}{\sqrt{jw_1}} \coth(\sqrt{jw_1})$$

e che ci comunica che l'elemento Warburg open si comporta come una serie RC in bassa frequenza e come un elemento Warburg semplice in alta frequenza.

### 2.3.2.3 Elemento a fase costante

Un'altra impedenza di grande interesse è quella associata al cosiddetto *elemento a fase costante* (Constant Phase Element, CPE), il cui simbolo circuitale è riportato in Figura 2.8.

È bene discutere innanzitutto il concetto fisico alla base di questo elemento. Si consi-



Figura 2.8: Elemento CPE, simbolo circuitale.

deri la superficie di un elettrodo. Secondo la modellizzazione, elementare fatta in sezione 2.3.2.1 dovremmo considerare l'interfaccia elettrodo-elettrolita come un parallelo RC. In realtà la superficie dell'elettrodo è influenzata localmente da impurità e difetti cristallografici di varia natura così che non tutta la superficie sarà interessata da fenomeni di conduzione come pure non tutta la superficie sarà assimilabile all'armatura di un condensatore. L'effetto è ancora più vero per elettrodi porosi. Un modello più realistico dovrebbe proporsi di studiare tale interfaccia come una rete di elementi R e C (non necessariamente aventi tutti pari valore) distribuiti lungo tutta l'estensione dell'elettrodo. Questo significa che l'elettrodo risponderà con costanti di tempo localmente diverse a variazioni introdotte nel sistema, col risultato che (complessivamente) il tempo di transizione del sistema al nuovo punto di equilibrio sarà descritto da una legge di potenza anziché esponenziale: questo comportamento è definito di tipo *non-Debye*.

Riassumendo, parte del sistema elettrochimico richiede una descrizione a parametri distribuiti anziché concentrati a causa della sua dimensione finita anziché infinitesima. Ciò non toglie che a partire da un modello a parametri distribuiti non sia possibile ottenere una buona descrizione a parametri concentrati del sistema, perlomeno entro un limitato intervallo di frequenze. La soluzione a questo problema è stata introdotta da Kenneth S. Cole (1928) concretizzandosi nell'impedenza:

$$(2.41) \quad Z_{CPE} = \frac{1}{T(jw)^n}, \quad 0 \leq n \leq 1, T > 0$$

con  $T$  ed  $n$  funzioni della temperatura ma costanti in frequenza. Questo elemento ha modulo e fase rispettivamente pari a

$$(2.42) \quad |Z_{CPE}| = \frac{1}{Tw^n}$$

$$(2.43) \quad \angle Z_{CPE} = -(n90)^\circ$$

dove per il calcolo della (2.43) si ricordano le due semplici regole di algebra complessa  $\angle(A \cdot B) = \angle A + \angle B$  e  $\angle(A/B) = \angle A - \angle B$ . I grafici descrittivi di questa impedenza sono di immediata comprensione: il diagramma di Bode di  $|Z_{CPE}|$  è quello di un sistema avente un polo nell'origine (per quanto elevato a potenza frazionaria), la fase è costante; il diagramma di Nyquist consiste in una semiretta uscente dall'origine con pendenza definita dalla (2.43).

Cerchiamo ora di dare un significato ai parametri  $T$  ed  $n$  attraverso lo studio dei due casi limite  $n = 0$  e  $n = 1$ :

$$(2.44) \quad Z_{CPE} = \begin{cases} \frac{1}{T} & n = 0 \\ \frac{1}{jwT} & n = 1 \end{cases}$$

che corrispondono nel primo caso ad una resistenza di valore  $1/T$  e nel secondo caso ad un condensatore di valore  $T$ . Il valore di  $n$  è quindi un indice che descrive la tendenza dell'elemento CPE verso un comportamento resistivo piuttosto che capacitivo. Riassumendo, l'elemento CPE è un componente artificiale che cerca di modellizzare le deviazioni dall'idealità dei sistemi elettrochimici.

Vogliamo osservare infine un terzo caso numerico di rilievo: per  $n = 0.5$  e  $T = 1/(\sqrt{2}Z_W)$  la (2.41) coincide con l'impedenza descrivente l'elemento di Warburg (relazione (2.35)). Questo fatto può essere letto in più modi. Innanzitutto va detto che non c'è incoerenza tra i fenomeni fisici alla base dei due elementi circuitali: si può dimostrare che anche l'elemento di Warburg è derivabile ragionando su elementi distribuiti, e se ne possono derivare le formule attraverso la teoria delle linee di trasmissione. Il fatto alla base di questa possibilità è che Warburg descrive un fenomeno, quale la diffusione, intrinsecamente coerente con una linea di trasmissione in quanto in entrambi i casi si tratta di sistemi con ritardo (nei quali la risposta è traslata temporalmente, quindi non in fase, rispetto allo stimolo applicato) e la cui estensione spaziale è molto maggiore delle distanze caratteristiche del sistema (lunghezza d'onda per una linea di trasmissione, lunghezza media di diffusione per un sistema elettrochimico).

In secondo luogo va sottolineato che l'elemento CPE si applica bene a descrivere sistemi disomogenei diversi, dunque non è errato scegliere di farne uso per descrivere fenomeni come la diffusione. L'elemento di Warburg tuttavia è specifico per la trattazione dei fenomeni diffusivi, quindi nella loro trattazione è uso comune impiegare questo al posto dell'elemento CPE.

### 2.3.3 Fit circuitali

Lo scopo ultimo della tecnica di misura EIS consiste nell'interpretare i dati raccolti alla luce di un modello fisico, così da ricavarne informazioni sullo stato dell'elettrodo e sui processi che intercorrono nella cella elettrochimica. Tale modello fisico è a sua volta studiato attraverso un modello circuitale equivalente i cui componenti essenziali sono stati già introdotti in sezione 2.3.2. Va osservato che tra di essi manca un componente elettronico di base, l'induttore; esso non ha corrispondenti fisici in una cella elettrochimica a riposo, tuttavia non è escluso che possa comparire per modellizzare effetti interni all'apparato di misura (ad esempio induttanze serie parassite dei cavi che collegano gli elettrodi col generatore di segnale) oppure fenomeni di corrosione alla superficie dell'elettrodo.

In definitiva il processo di analisi consiste in:

1. costruire i diagrammi di Bode e Nyquist dai dati misurati;
2. costruire un modello elettrico coerente col processo fisico in corso nella cella. Qualora il processo sia incognito, dunque sia esso stesso l'oggetto dell'indagine spettroscopica, è consigliabile partire da un modello elementare (come il circuito di Randles di sezione 2.3.2) e complicarlo gradualmente, sempre cercando di associare un significato fisico all'aggiunta di un nuovo elemento elettrico. Il processo di aggiunta va fatto successivamente all'operazione di *fit* descritta al punto 3, rendendo questo un algoritmo iterativo;
3. dai dati raccolti si costruisce un'ipotesi iniziale (*initial guess*) sui valori da associare a tutti o alcuni dei diversi componenti del modello elettrico. A questo punto, aiutati da software dedicati (sezione 2.3.3.1), si calcolano i valori dei componenti tali da approssimare al meglio i dati misurati. Questa è l'operazione cosiddetta di *fit circuitale*. Un fit insoddisfacente richiederà di rivedere il modello elettrico ed even-

tualmente aggiungere, togliere o modificare dei componenti. È molto importante in questa fase tenere bene presente la corrispondenza tra modello elettrico e fisico:

- primo, perché un modello può approssimare bene i dati sperimentali ma per valori non sensati dei componenti elettrici. Questo può tuttavia fornire indicazioni per affinare il fit: se ad esempio per una resistenza si è ricavato un valore molto piccolo è sensato pensare di sostituire tale elemento con un cortocircuito;
  - secondo, perché un modello con troppi elementi ha sufficienti gradi di libertà da poter approssimare verosimilmente qualsiasi insieme di dati misurati. Peraltro si può mostrare che è possibile ottenere un fit anche con reti diverse a pari numero di gradi di libertà (problema cosiddetto della *non unicità del fit*);
4. infine si raccolgono i valori dei parametri di fit e attraverso di essi si cerca di fare luce sul processo fisico avvenuto nella cella. Se ad esempio il valore della resistenza di trasferimento di carica (sezione 2.3.2.1) è cresciuto nel tempo si può ipotizzare un degrado delle proprietà di trasferimento elettronico indotte da un degrado della superficie dell'elettrodo.

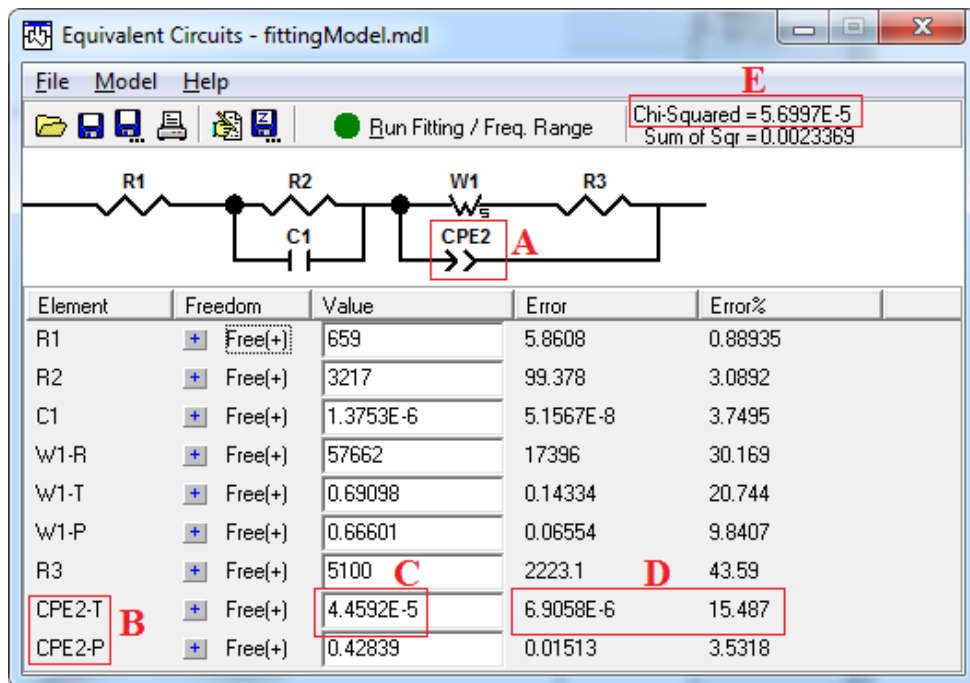


Figura 2.9: Finestra del tool di fit circuitale integrato in ZView 2.80. Per ogni componente (A) è indicato il set di parametri associati (B), il valore ottimo calcolato per ciascuno di essi (C) e l'errore associato a tale valore (D). La bontà del fit è indicata dal parametro statistico  $\chi^2$  (E) il cui valore ideale è zero; nella pratica, un fit accettabile è indicato da valori inferiori a  $10^{-4}$ , oppure dell'ordine di  $10^{-4}$  in presenza di rumore di misura. Il parametro  $\chi^2$  afferisce al metodo dei minimi quadrati applicato a sistemi non lineari (NLLS, Non-Linear Least Squares).

### 2.3.3.1 Il software ZView

Per la presente Tesi si è fatto uso del software di fit circuitale ZView 2.80 prodotto da Scribner Associates Incorporated. Il software consente di caricare dei dati di misura nel formato .z, costruisce da essi i diagrammi di Bode e Nyquist e mette a disposizione un tool di fit. Attraverso di esso è possibile assemblare un circuito equivalente (Figura 2.9) e

ricavare i valori ottimi dei componenti tali da meglio approssimare i dati sperimentali, o una porzione di essi.

In questa sede ci limiteremo a evidenziare le corrispondenze tra la simbologia impiegata in ZView e quella sviluppata nei precedenti capitoli, così da allacciare i dati numerici forniti dal software col significato fisico esposto in questa Tesi. Il confronto è sviluppato nelle Tabelle che seguono. Va osservato che l'elemento Warburg per diffusione in un mezzo semi-infinito non è direttamente incluso in ZView.

### Warburg short

Espressione teorica:  $Z_s \stackrel{2.36}{=} \stackrel{2.37}{=} Z_W L \sqrt{\frac{2}{D}} \frac{1}{\sqrt{j\omega L^2/D}} \tanh(\sqrt{j\omega L^2/D})$

Formula ZView:  $Z = \frac{R}{(IT\omega)^P} \tanh(IT\omega)^P$

Come si può notare, ZView implementa direttamente l'elemento GFW introdotto in sezione 2.3.2.2. Le corrispondenze tra parametri sono evidenziate in Tabella 2.1. La formula ZView è copiata dalla guida in linea del software; i parametri ZView  $R, T, P$  sono preceduti dalla sigla "Ws-", indicante l'elemento Warburg short, perché tale è la notazione impiegata dal software internamente al tool di fit.

Parametri ZView	Corrispondenza
$I$	$j = \sqrt{-1}$
Ws- $R$	$Z_W L \sqrt{\frac{2}{D}}$
Ws- $T$	$L^2/D$
Ws- $P$	0.5

Tabella 2.1: Corrispondenze tra i parametri definiti in ZView e i loro equivalenti del modello teorico. Elemento Warburg short.

### Warburg open

Espressione teorica:  $Z_o \stackrel{2.37}{=} \stackrel{2.40}{=} Z_W L \sqrt{\frac{2}{D}} \frac{1}{\sqrt{j\omega L^2/D}} \tanh(\sqrt{j\omega L^2/D})$

Formula ZView:  $Z = \frac{R}{(IT\omega)^P} \coth(IT\omega)^P$

Come si può notare, ZView implementa direttamente l'elemento generalizzato. Le corrispondenze tra parametri sono evidenziate in Tabella 2.2.

Parametri ZView	Corrispondenza
$I$	$j = \sqrt{-1}$
Wo- $R$	$Z_W L \sqrt{\frac{2}{D}}$
Wo- $T$	$L^2/D$
Wo- $P$	0.5

Tabella 2.2: Corrispondenze tra i parametri definiti in ZView e i loro equivalenti del modello teorico. Elemento Warburg open.

### Elemento a fase costante

Espressione teorica:  $Z_{CPE} \stackrel{2.41}{=} \frac{1}{T(jw)^n}$ ,  $0 \leq n \leq 1$ ,  $T > 0$

Formula ZView:  $Z = \frac{1}{T(Iw)^P}$

Le corrispondenze tra parametri sono evidenziate in Tabella 2.3.

Parametri ZView	Corrispondenza
$I$	$j = \sqrt{-1}$
$T$	$T$
$P$	$n$

Tabella 2.3: Corrispondenze tra i parametri definiti in ZView e i loro equivalenti del modello teorico. Elemento CPE.

### 2.3.3.2 Esempi

Abbiamo affermato, nel punto 3 all'inizio di sezione 2.3.3, che dai dati raccolti si deve procedere a costruire un'ipotesi iniziale sui valori da associare ai componenti del modello elettrico. Abbiamo inoltre affermato che il circuito elettrico si costruisce a partire dai diagrammi di Bode e Nyquist ricavati dalle misure svolte, e sempre tenendo in considerazione il significato fisico di ciascun elemento. In questa sezione cercheremo di approfondire questa tematica attraverso circuiti di uso comune, così da fornire una casistica di base e un approccio con cui orientarsi nell'operazione di fit circuitale. Gli esempi riportati sono finalizzati a mostrare aspetti specifici del problema e non pretendono di svolgere un'analisi esaustiva dei singoli casi.

#### Cella minima con resistenza di conduzione

Partiamo col valutare un caso semplice: la cella minima di Figura 2.6 con in serie la resistenza  $R_{sol}$  che tiene conto delle cadute di potenziale attraverso la soluzione. Va detto fin da subito che l'impiego di questo circuito, privo dell'elemento di Warburg, è giustificato nel caso in cui non vi sia da tenere in conto la diffusione di una specie redox in soluzione. Questo è possibile qualora la specie redox sia assente (misura *senza mediatore*) oppure qualora il mediatore sia presente ma la sua diffusione sia molto più veloce della reazione di trasferimento elettronico all'interfaccia, così che il processo sia insensibile a problematiche di trasporto di massa e invece limitato dalla velocità della reazione redox (*processo a controllo di trasferimento di carica*). Si usa anche dire che il trasferimento di carica è il *controllo cinetico* del processo.

L'impedenza equivalente del circuito è:

$$(2.45) \quad Z(s) = R_{sol} + \frac{R}{1 + sRC_d}$$

dove al solito il comportamento in frequenza si ottiene sostituendovi  $s = jw$ . I diagrammi di Bode e Nyquist sono riportati in Figura 2.10 insieme al modello circuitale completo. Possiamo fare alcune osservazioni pratiche, il cui scopo è orientare le operazioni di fit svolgendo il minor numero possibile di calcoli:

- Il diagramma di  $|Z(jw)|$  è costante alle alte come alle basse frequenze, rispettivamente sui valori  $2000\Omega$  e  $500\Omega$ . Possiamo estendere questa affermazione e dire che

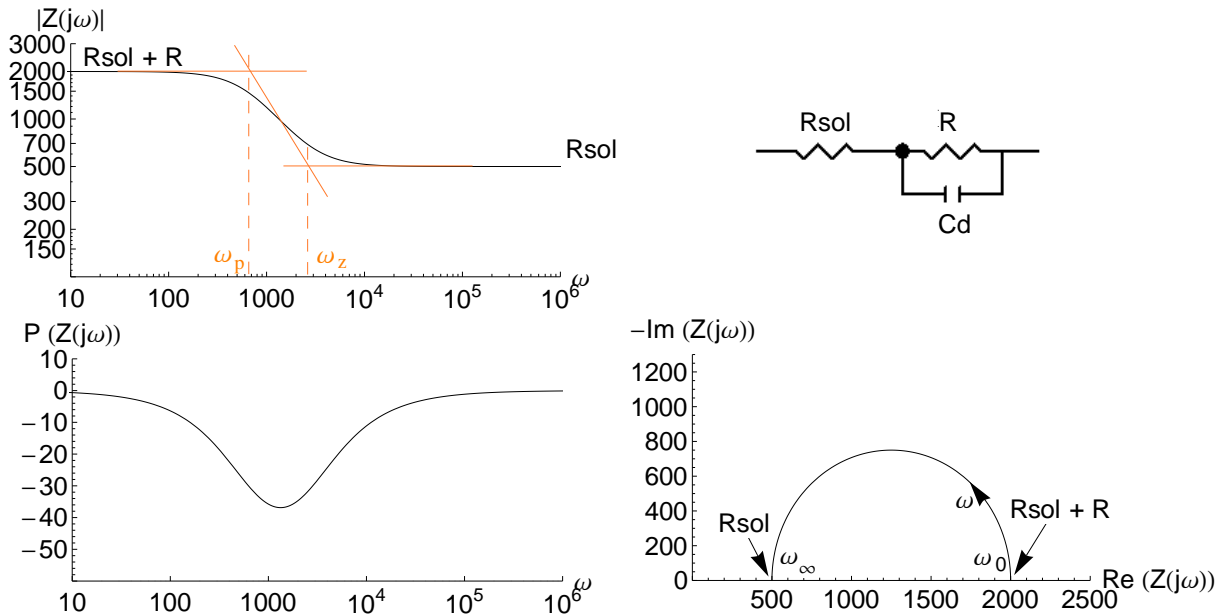


Figura 2.10: Diagrammi di Bode e Nyquist della cella minima con resistenza di conduzione, valutati per  $R_{sol} = 500\ \Omega$ ,  $R = 1500\ \Omega$ ,  $C_d = 1\ \mu F$ . In alto a destra il modello circuitale ZView.

$|Z(j\omega = 0)| = 2000\ \Omega$  e che  $|Z(j\omega \rightarrow \infty)| = 500\ \Omega$ . Questa affermazione è supportata dal diagramma di Nyquist. Ora, studiamo il circuito nelle due condizioni indicate:

1. per  $\omega = 0$   $C_d$  è un aperto e la rete si riduce alla serie di  $R_{sol}$  e  $R$ , pertanto  $2000\ \Omega = R_{sol} + R$ ;
2. per  $\omega \rightarrow \infty$   $C_d$  è un cortocircuito e la rete si riduce al solo  $R_{sol}$ , pertanto  $500\ \Omega = R_{sol}$ .

Abbiamo correttamente dedotto dai soli grafici che  $R_{sol} = 500\ \Omega$ ,  $R = 2000\ \Omega - R_{sol} = 1500\ \Omega$ .

- Osserviamo che il diagramma di Nyquist è un semicerchio perfetto. Se consideriamo la quantità  $Z(j\omega) - R_{sol}$ , essendo  $R_{sol}$  numero reale puro, questa operazione corrisponde a traslare orizzontalmente il diagramma di Nyquist di  $Z(j\omega)$  portando  $\omega_\infty$  nell'origine. Essendo il diagramma un semicerchio il punto di massimo assoluto si troverà all'intersezione con la bisettrice, tale quindi che  $Re(Z(j\omega) - R_{sol}) = -Im(Z(j\omega) - R_{sol})$ . Individuiamo questa condizione nella relazione (2.45):

$$(2.46) \quad Z(j\omega) - R_{sol} = \frac{R}{1 + j\omega RC_d} = \frac{R(1 - j\omega RC_d)}{1 + (\omega RC_d)^2} = \frac{R}{1 + (\omega RC_d)^2} - \frac{j\omega R^2 C_d}{1 + (\omega RC_d)^2}$$

da cui si ricava che la condizione è verificata per  $R = \omega^2 R^2 C_d$  cioè per  $\omega \triangleq \omega_{max} = 1/(RC_d)$ . Qualora dalle misure svolte si conosca il valore di  $\omega$  associato al punto di massimo, o un valore nelle sue vicinanze, è possibile stimare il valore di  $C_d$  da usare come ipotesi iniziale per il fit.

Naturalmente era possibile ricavare le stesse informazioni ragionando sulla funzione di trasferimento esatta (2.45), che scritta in forma di Bode è:

$$(2.47) \quad Z(s) = (R_{sol} + R) \frac{1 + sRR_{sol}C_d/(R_{sol} + R)}{1 + sRC_d}$$

da cui si ricava che il guadagno in continua è  $R_{sol} + R$  e che la posizione del polo e dello zero è rispettivamente  $w_p = 1/(RC_d) = w_{max}$  e  $w_z = (R_{sol} + R)/(RR_{sol}C_d)$ . Essendo tutti questi dati (guadagno in continua,  $w_p$ ,  $w_z$ ) ricavabili direttamente dal diagramma di Bode di  $|Z(jw)|$  è possibile stimare il valore di tutti i parametri. Una nota: la retta obliqua (arancione in Figura 2.10) non è tangente alla curva di  $|Z(jw)|$  come dovrebbe; polo e zero indicati in Figura sono tuttavia corretti. Questo non deve stupire, essendo una conseguenza dell'eccessiva vicinanza tra  $w_p$  e  $w_z$  rilevabile anche nel diagramma della fase (dopo  $w_p$  la fase torna a crescere prima di aver toccato  $-90^\circ$ ).

Questo modo di procedere, corretto, diventa tuttavia inapplicabile per circuiti complessi e facenti uso di componenti non lineari (come l'elemento di Warburg o l'elemento CPE). È tuttavia possibile, nei limiti del ragionevole, scomporre il circuito in sottoreti e valutare l'effetto di ciascuno sulla risposta complessiva del sistema. Questo approccio verrà usato in un prossimo esempio (Cella di Randles).

### Cella minima con elemento a fase costante e resistenza di conduzione

Lo scopo di questo esempio è unicamente mostrare cosa succede sostituendo il condensatore  $C_d$  nel precedente esempio con un elemento CPE. La Figura 2.11 mostra il nuovo circuito e i relativi diagrammi di Bode e Nyquist. L'impedenza equivalente del circuito è:

$$(2.48) \quad Z(s) = R_{sol} + \frac{Z_{CPE}R}{Z_{CPE} + R} \stackrel{2.41}{=} R_{sol} + \frac{R}{1 + RT(jw)^n}$$

Come si può notare continuano a valere le osservazioni fatte nell'esempio precedente ri-

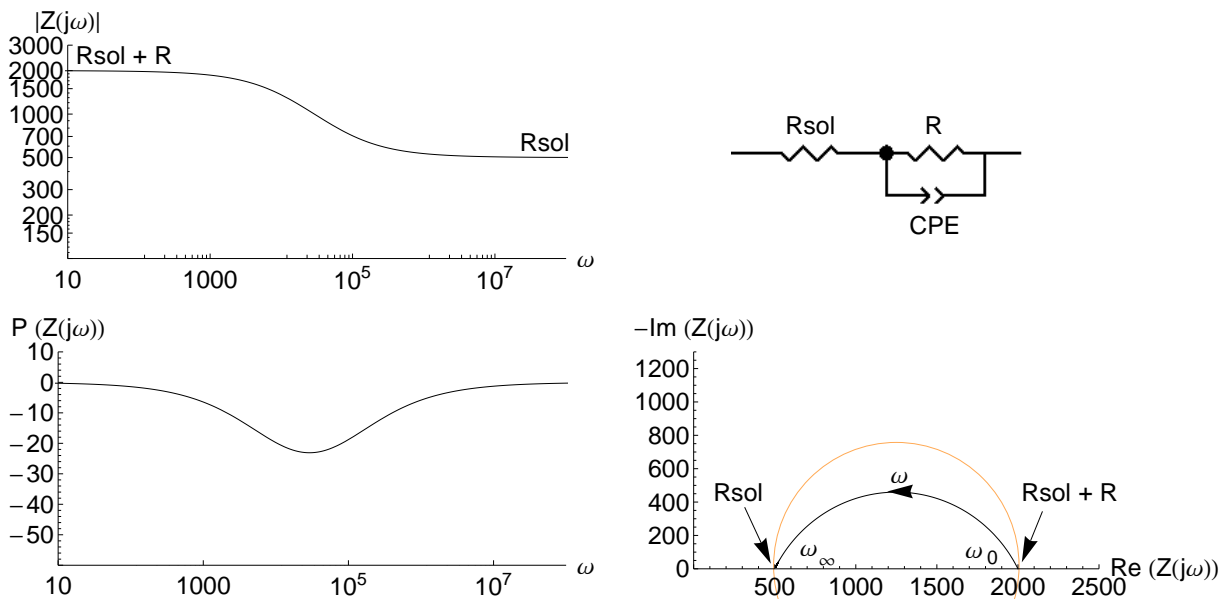


Figura 2.11: Diagrammi di Bode e Nyquist della cella minima con CPE e resistenza di conduzione, valutati per  $R_{sol} = 500\Omega$ ,  $R = 1500\Omega$ ,  $T = 10^{-6}$ ,  $n = 0.7$ . In alto a destra il modello circuitale ZView.

guardo a  $w_0$  e  $w_\infty$ , ma a differenza di prima il Nyquist non è un semicerchio perfetto (quest'ultimo riportato in arancione per confronto). Lo scopo di quest'esempio in conclusione è mostrare una delle tipiche applicazioni dell'elemento CPE nel fit circuitale: modellizzare deviazioni dal comportamento semicircolare di archi nel diagramma di Nyquist.

### Cella di Randles con elemento Warburg short

Consideriamo la cella di Randles di Figura 2.7 dove per avvicinarci a casi più realistici



supponiamo che l'impedenza di diffusione sia un elemento Warburg short. Questo tipo di circuito ha senso fisico in presenza di un mediatore redox in soluzione e tale che la sua velocità di diffusione sia l'elemento che limita la risposta complessiva del sistema (*processo a controllo di trasferimento di materia*). La Figura 2.12 mostra il circuito e i relativi diagrammi di Bode e Nyquist. L'impedenza equivalente del circuito è:

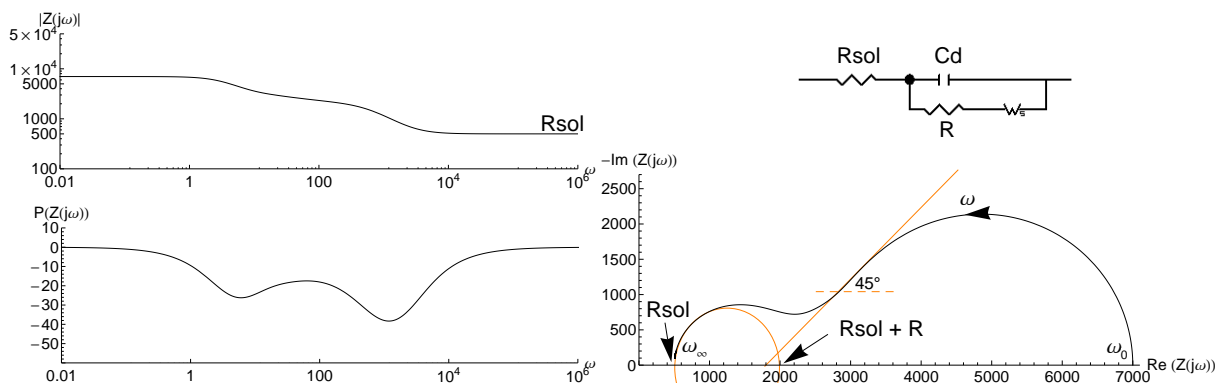


Figura 2.12: Diagrammi di Bode e Nyquist della cella di Randles con elemento Warburg short, valutati per  $R_{sol} = 500\Omega$ ,  $R = 1500\Omega$ ,  $C_d = 1\mu F$ ,  $W_s-R = 5000$ ,  $W_s-T = 0.7$ . In alto a destra il modello circuitale ZView.

$$(2.49) \quad Z(s) \stackrel{2.41}{=} R_{sol} + \frac{(R_{ct} + Z_s)/(j\omega C_d)}{R_{ct} + Z_s + 1/(j\omega C_d)}$$

dove  $Z_s(j\omega)$  è definita dalle relazioni (2.37) e (2.38). È immediato vedere che la relazione (2.49) è troppo difficile da trattare direttamente; possiamo fare tuttavia alcune osservazioni sul diagramma di Nyquist:

- La presenza di un arco in bassa frequenza suggerisce la presenza di un condensatore oppure di un elemento Warburg short; la pendenza a  $45^\circ$  con cui l'arco si chiude verso le alte frequenze consente di discriminare a favore della seconda ipotesi;
- in alta frequenza il diagramma di Nyquist assume la forma che avrebbe in assenza dell'elemento di Warburg, già introdotta nel primo esempio (Cella minima con resistenza di conduzione). Detto altrimenti, la cinetica del processo passa da un controllo di trasferimento di materia a un controllo di trasferimento di carica. Questo è coerente con la nota già riportata in sezione 2.3.2.2, dove si è osservato che l'impedenza di Warburg diventa trascurabile in alta frequenza. In questa condizione è possibile ripetere i ragionamenti fatti nel primo esempio e ricavare dal diagramma di Nyquist i valori della resistenza di trasferimento di carica  $R$ , della resistenza di conduzione in soluzione  $R_{sol}$  e della capacità di double layer  $C_d$ . Si faccia però attenzione che questa volta il diagramma di Bode di  $|Z(j\omega)|$  ha guadagno in continua diverso da  $R_{sol} + R$ , mentre è facile vedere (imponendo  $\omega \rightarrow \infty$  nella rete circuitale) che il guadagno in alta frequenza è ancora  $R_{sol}$ .

Va osservato che se il trasferimento elettronico è molto lento  $R$  assumerà valori molto grandi col risultato che il semiarco associato al controllo di trasferimento di carica si estenderà verso le basse frequenze; in questa condizione c'è il rischio che il contributo diffusivo sia difficile da distinguere. Viceversa per valori di  $R$  troppo piccoli il semicerchio in alta frequenza potrà risultare troppo piccolo da individuare.



# Capitolo 3

## Banco di misura sperimentale

In questo Capitolo presentiamo i macchinari di laboratorio impiegati e i protocolli di preparazione e misura dei campioni. Tutte le procedure che hanno coinvolto molecole biochimiche sono state eseguite presso i laboratori di Anatomia e Fisiologia Umana del Dipartimento di Scienze Biomediche, Università di Padova.

### 3.1 Preparazione delle soluzioni

#### 3.1.1 Sostanze

Per realizzare le misure presentate in questa Tesi si è fatto uso di sostanze chimiche quali:

- ferrocianuro triidrato di potassio ( $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$ ), che in soluzione acquosa libera lo ione ferrocianuro  $Fe(CN)_6^{4-}$ . Il composto si presenta in forma solida (polvere) ed è innocuo in condizioni ordinarie, ma in ambiente molto acido può rilasciare acido cianidrico (HCN), altamente tossico.
- ferricianuro di potassio ( $K_3Fe(CN)_6$ ), che in soluzione acquosa libera lo ione ferricianuro  $Fe(CN)_6^{3-}$ . Come per il ferrocianuro, anche il ferricianuro è una polvere innocua ma in ambiente molto acido può rilasciare acido cianidrico (HCN). Il composto è inoltre passibile di degradazione in presenza di radiazione ultravioletta e pertanto va schermato dalla luce solare; questa operazione è stata realizzata avvolgendo in fogli di alluminio ogni fiala contenente ferricianuro in soluzione.
- $\beta$ -nicotinammide adenina dinucleotide ridotto ( $\beta$ -NADH o semplicemente NADH), sale disodico idrato; la formula di struttura è riportata in Figura 3.1. Il composto si presenta sotto forma di polvere igroscopica. In soluzione esso si degrada in presenza di radiazione ultravioletta, pH poco alcalino o temperature superiori a 4 °C; la presenza di ioni fosfato ( $PO_4^{3-}$ ) accelera il processo di degradazione. Per ovviare a questi problemi la polvere di NADH è stata diluita a non più di 8 ore di distanza dalla misura, ogni fiala avvolta in fogli di alluminio e immagazzinata in congelatore o sotto ghiaccio. Per le sole misure presentate in questa Tesi (che non coprono la totalità dei test portati a termine) sono stati volontariamente impiegati a scopo di confronto solventi neutri oltre che alcalini.

Le tre sostanze sono state fornite in boccette da Sigma-Aldrich (codici prodotto rispettivamente P3289, 244023 e N8129) e sono state maneggiate con guanti monouso Microflex UltraSense in nitrile, in aria oppure sotto cappa aspirata quando necessario.

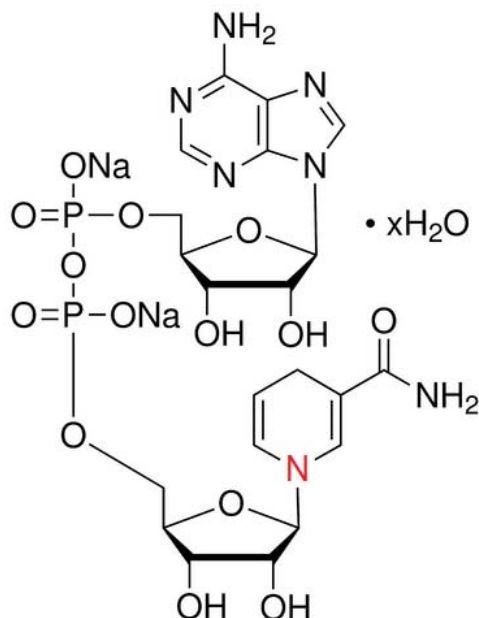


Figura 3.1: Formula di struttura della molecola organica NADH. In rosso è indicato il sito di ossidazione [fonte: [www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/n8129](http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/n8129)].

### 3.1.2 Solventi

Come solventi sono stati impiegati:

- acqua purificata deionizzata milliQ, ottenuta per filtrazione meccanica attraverso un macchinario brevettato da Millipore Corporation. Il grado di purezza è monitorato misurando la resistenza elettrica, che in condizioni standard deve raggiungere il valore di  $18.2M\Omega$ ;
- tamponi semplici: PBS (*Phosphate Buffered Saline*, tampone fosfato salino) e HBRS (*HEPES-buffered Ringer solution*, soluzione di Ringer tamponata con HEPES). Una soluzione tampone, o *buffer*, è una soluzione che tende a mantenere costante il pH qualora altre sostanze siano addizionate; questa è una proprietà gradita essendo che spesso le proprietà di un sistema chimico o biologico risultano essere molto sensibili a variazioni del pH.
- liquidi di coltura cellulare complessi: DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, mezzo di Eagle con modifiche di Dulbecco). Nel seguito ci si riferirà al liquido di coltura anche con l'espressione *matrice complessa*.

Riportiamo di seguito la composizione esatta dei solventi, milliQ a parte, nell'ordine in cui sono stati approcciati durante la nostra attività di Tesi.

#### 3.1.2.1 Composizione chimica del buffer PBS 1x

In Tabella 3.1 è riportata la composizione chimica del buffer comunemente indicato come PBS 1x. Il buffer è stato realizzato per diluizione 1:10 a partire da PBS 10x, quest'ultimo ottenuto disciogliendo i sali in polvere (Sigma-Aldrich, codice prodotto P3813) in 100 ml di acqua purificata deionizzata milliQ.

<b>Sali inorganici</b>	
Cloruro di sodio	138 mM
Cloruro di potassio	2.7 mM
Idrogenofosfato di disodio	10 mM
Fosfato monopotassico	1.8 mM

Tabella 3.1: Composizione chimica del buffer PBS 1x.

### 3.1.2.2 Composizione chimica del liquido di coltura DMEM

<b>Amminoacidi</b>	
Glicina	30 mg/l
L-alanil-L-glutammina	862 mg/l
L-arginina cloridrato	84 mg/l
L-cistina	48 mg/l
L-istidina cloridrato monoidrato	42 mg/l
L-isoleucina	105 mg/l
L-leucina	105 mg/l
L-lisina cloridrato	146 mg/l
L-metionina	30 mg/l
L-fenilalanina	66 mg/l
L-serina	42 mg/l
L-treonina	95 mg/l
L-triptofano	16 mg/l
L-tirosina sale disodico diidrato	89.47 mg/l
L-valina	94 mg/l
<b>Sali inorganici</b>	
Cloruro di calcio	264.93 mg/l
Nitrato ferrico nonaidrato	0.10 mg/l
Solfato di magnesio	97.67 mg/l
Cloruro di potassio	400 mg/l
Sodio bifosfato diidrato	141.31 mg/l
Bicarbonato di sodio	3700 mg/l
Cloruro di sodio	6400 mg/l
<b>Vitamine</b>	
Colina cloruro	4 mg/l
Calcio D-pantotenato	4 mg/l
Acido folico	4 mg/l
Mioinositolo	7.20 mg/l
Nicotinammide	4 mg/l
Piridossale cloridrato	4 mg/l
Riboflavina	0.40 mg/l
Tiamina cloridrato	4 mg/l
<b>Altri componenti</b>	
D-glucosio anidro	4500 mg/l
Rosso fenolo	15 mg/l

Tabella 3.2: Composizione chimica del liquido di coltura cellulare DMEM.

In Tabella 3.2 è riportata la composizione chimica del liquido di coltura cellulare DMEM. Il liquido è stato fornito dall'azienda EuroClone e risponde al codice prodotto

ECM0103L. Alle sostanze indicate in Tabella ne sono state addizionate tre: piruvato di sodio 1 mM (fornito da Sigma-Aldrich, codice prodotto S8636), gentamicina 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (Sigma-Aldrich, codice prodotto G1272) ed HEPES 4 mM (Euroclone, codice prodotto ECM 0180D).

Va segnalato che, se esposto all'aria, il DMEM tende ad alcalinizzarsi rapidamente per effetto del bicarbonato di sodio in esso contenuto. Questa condizione è segnalata dal cambio di colore indotto dal rosso fenolo, il cui ruolo in soluzione è per l'appunto quello di indicatore di pH; le figure 3.2 e 3.3 mostrano la relazione colore-pH per il rosso fenolo e alcuni campioni maneggiati in laboratorio.

Per contrastare la variazione di pH vari è possibile adottare alcuni accorgimenti. Il più

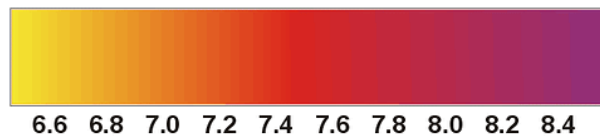


Figura 3.2: Relazione colore-pH per il rosso fenolo.

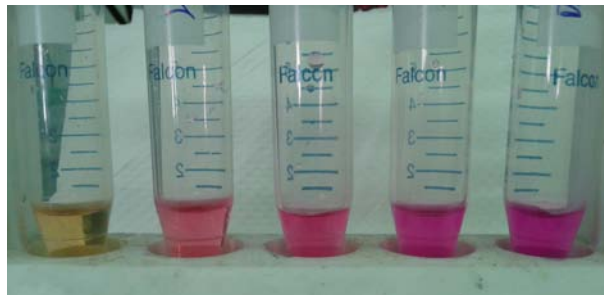


Figura 3.3: Campioni di DMEM a differenti valori di pH: da sinistra, esso vale 6.50, 7.08, 7.34, 8.22, 9.26.

semplice consiste nel minimizzare il rapporto tra volume di aria e volume di DMEM in provetta nonché la superficie di contatto, e prevede quindi di mantenere le provette il più possibile piene e in posizione verticale; il pH varierà comunque (è ancora presente aria), ma più lentamente. In alternativa è possibile immagazzinare il DMEM in siringhe, eliminando l'origine stessa del problema. Nel nostro caso il DMEM è stato immagazzinato in frigorifero nella confezione originale da 500 ml da cui sono state prelevate aliquote da 15 ml (in provetta Falcon di plastica) o da 2 ml (in provetta Eppendorf di plastica) al bisogno; la Figura 3.4 mostra i contenitori indicati.

### 3.1.2.3 Composizione chimica del buffer HBRS

<b>Sali inorganici</b>	
Cloruro di sodio	125 mM
Cloruro di potassio	2.6 mM
Fosfato monopotassico	1.2 mM
Solfato di magnesio	1.2 mM
Cloruro di calcio	1.0 mM
<b>Altri componenti</b>	
HEPES	10 mM

Tabella 3.3: Composizione chimica del buffer HBRS.



Figura 3.4: Confezione di stoccaggio di DMEM (sinistra) e provette. In centro una provetta Falcon di plastica da 15 ml; a destra una provetta Eppendorf di plastica da 2 ml.

In Tabella 3.3 è riportata la composizione chimica del buffer HBRS; il buffer è stato prodotto internamente al gruppo di ricerca a partire dai componenti indicati in Tabella. Si osservi l'assenza di bicarbonato di sodio, tale da evitare i problemi riscontrati col DMEM in caso di esposizione all'aria. Si osservi inoltre l'assenza di vitamine e amminoacidi: l'HBRS non è un liquido di coltura. Esso è tuttavia un *liquido di mantenimento*: è stato verificato che le cellule muscolari sopravvivono in HBRS per almeno 24 ore, un tempo considerato sufficiente a consentire alle cellule di esprimere quell'acido lattico la cui rilevazione è lo scopo del progetto MyoScreen.

### 3.1.3 Pesate e diluizioni

Per pesare le polveri da diluire si è fatto ricorso a una bilancia di precisione con sensibilità pari a 0.1 mg. Considerando che le quantità pesate rientravano tipicamente nell'ordine di 1÷10 mg si è reso necessario tenere in considerazione come l'errore sulla pesata si propaghi sul valore di concentrazione in soluzione della sostanza; come approccio generale si è cercato di mantenere tale errore sotto a 1%.

Un altro elemento da tenere in considerazione durante una pesata è la stabilità della misura. Il valore misurato può variare in funzione di molteplici fattori: i più comuni sono vibrazioni del banco di misura e spostamenti della cartina posta sul piatto della bilancia (e su cui viene deposta la polvere). Correnti d'aria possono avere lo stesso effetto. Va tuttavia considerato che se la polvere è igroscopica tenderà in pochi minuti ad assorbire umidità dall'aria, incrementando il valore misurato; in questi casi è prioritario che la pesata sia veloce. Dopo la pesata la polvere viene trasferita in provetta per essere diluita; a questo punto è opportuno pesare nuovamente la cartina per verificare se frazioni di polvere vi siano rimaste attaccate, ed eventualmente sottrarre tale contributo dalla pesata.

Un'ultima considerazione va fatta sul protocollo di misura: è sempre buona norma evitare contaminazioni della polvere in boccetta: la polvere può uscirne, ma non rientrarvi; qualunque sia il valore pesato si provvederà a raggiungere la concentrazione voluta adeguando il volume del solvente.

Per quanto riguarda le diluizioni, esse sono state realizzate maneggiando i solventi liquidi con pipettatrici manuali (Figura 3.5) equipaggiate con puntali in plastica monouso. Una

pipettatrice è uno strumento capace di aspirare un volume prefissato e regolabile di liquido nella camera interna del puntale, ed è contraddistinta da un numero preceduto dalla lettera P. Esso identifica la pipettatrice come capace di maneggiare volumi, espressi in  $\mu l$ , tra il 10% e il 100% di quel numero; una P200 ad esempio gestisce volumi tra 20  $\mu l$  e 200  $\mu l$ .

La struttura di una pipettatrice è la seguente:

- il corpo consente la presa da parte dell'utente e alloggia al suo interno la meccanica necessaria all'aspirazione del liquido, in sostanza una pompa a vuoto;
- in testa alla pipettatrice è presente un pistone per l'emissione e l'immissione di liquido da e verso il puntale. Quando la corsa del pistone termina, in fase di emissione, è previsto che sia possibile spingere ulteriormente (sovracomprimere, diciamo) per generare un piccolo flusso d'aria verso l'esterno; questo agevola l'espulsione di eventuali gocce rimaste in camera. È importante però che non avvenga immissione di liquido se il pistone è sovracompresso, o si rischia di aspirare liquido fin dentro la pompa a vuoto compromettendo la pipettatrice;
- la regolazione del volume da aspirare si può ottenere ruotando una ghiera circolare posta sul corpo della pipettatrice, solitamente in alto verso il pistone. In alcuni modelli è possibile ruotare direttamente il pistone per ottenere lo stesso effetto. Nei modelli più recenti è inoltre previsto un sistema di blocco che, se attivato, impedisce la rotazione della ghiera o del pistone così da garantire che il volume non venga accidentalmente variato durante l'uso. Va osservato che le indicazioni numeriche di volume poste sul lato della ghiera possono recare cifre in nero come in rosso. Le cifre nere vanno intese come cifre semplici; quelle rosse portano con sé un fattore moltiplicativo 10 (se presenti in alto sulla ghiera) o 0.1 (se presenti in basso). Ad esempio i numeri 060 e 100 su una pipettatrice P1000 indicano volumi rispettivamente pari a 600  $\mu l$  e 1000  $\mu l$ ; il numero 157 su una pipettatrice P20 indica un volume pari a 15.7  $\mu l$ ;
- il puntale è alloggiato per incastro in coda alla pipettatrice. Per evitare contaminazioni tra il liquido e i guanti dell'operatore è presente un pulsante di rilascio che sgancia il puntale a fine uso.

L'impiego delle pipettatrici richiede alcune cure: in particolare è necessario che l'operazione di rilascio del pistone sia lenta a sufficienza da non aspirare nel puntale un volume maggiore di quello voluto, situazione che può verificarsi soprattutto in presenza di liquidi molto densi come il DMEM. Un secondo accorgimento riguarda il rilascio del liquido: dopo il rilascio è opportuno aspirare nuovamente del liquido dentro al puntale, rilasciare e ripetere alcune volte, così da pulire la camera interna del puntale.

Va inoltre segnalato che la plastica di cui è fatto il puntale può creare problemi con alcune sostanze organiche, ad esempio gli enzimi, che possono aderire alla parete interna falsando le operazioni di diluizione.

### 3.1.4 Lavaggio e asciugatura dei sensori

I dispositivi DropSens Carbon (DSC) sono stati spesso riutilizzati volontariamente in misure consecutive, come apparirà chiaro dai prossimi capitoli. Questo ha implicato la necessità di lavarne la superficie per eliminare il vecchio campione, e di asciugarla prima della deposizione del nuovo. Il lavaggio è stato realizzato con acqua milliQ usando una spruzzetta da laboratorio (Figura 3.6) e avendo cura di mantenere inclinato il sensore per evitare di bagnarne i contatti, col rischio di generare cortocircuiti. L'asciugatura è stata





Figura 3.5: Pipettatrici manuali in uso nel laboratorio BioDevices.

realizzata manualmente con getti d'aria direzionata oppure con l'ausilio di aria compressa.

Va segnalato che tutti i dispositivi, a prescindere dall'uso singolo o ripetuto, sono stati lavati e asciugati prima del loro primo utilizzo.

## 3.2 Misure di ciclovoltammetria

Le misure di ciclovoltammetria richiedono di pilotare in tensione la cella elettrochimica con un potenziostato, nel nostro caso il macchinario CH Instruments modello 440A ripor-



Figura 3.6: Spruzzetta da laboratorio.

tato in Figura 3.7. La cella consiste nel sensore DSC introdotto in sezione 1.4.

Per questa tipologia di misura la cella viene impiegata in modalità cosiddetta *a tre*



Figura 3.7: Potenziostato CHI440A. Sono indicati gli elementi hardware di rilievo per l'utilizzo da noi fatto dello strumento: A - pulsante di accensione, B - spia di funzionamento, C - connessione IEC C14 del cavo di alimentazione, D - porta di comunicazione USB (connettore tipo B), E - porta di comunicazione DIN con la cella elettrolitica.

*elettrodi*, ovvero facendo uso di tutti e tre gli elettrodi a disposizione: di lavoro, di riferimento e ausiliario. La connessione fisica del sensore con il circuito di misura è affidata all'interfaccia hardware prodotta da DropSens, codice prodotto DRP-DSC (Figura 1.7). Da questa escono tre cavi terminati da connettori a banana (lato sensore) e da connettori BNC femmina (lato potenziostato); un ulteriore cavo con terminali BNC maschio e DIN provvede a completare la connessione col potenziostato. A quest'ultimo è possibile collegare un computer attraverso un'uscita USB tipo A/B per la raccolta e analisi dati, operazione svolta con l'ausilio di un software dedicato prodotto da CH Instruments (ver-

sione 14.05). I connettori sono riassunti in Figura 3.9.



Figura 3.8: Interfaccia hardware DRP-DSC tra dispositivo elettrochimico e potenziostato CHI440A. È visibile un dispositivo DropSens DRP110 collegato e con sopra deposta una goccia di soluzione.

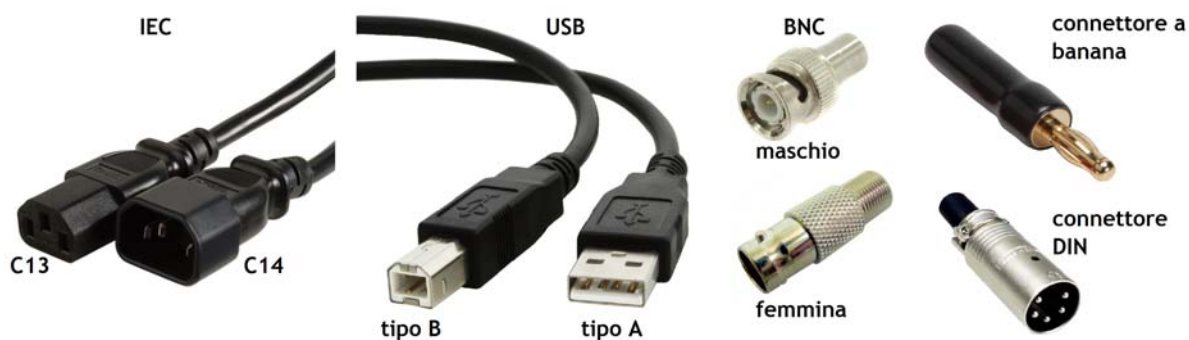


Figura 3.9: Tipologie di connettore in uso nel banco di misura ciclovoltammetrico.

### 3.3 Misure di spettroscopia d'impedenza

Le misure di spettroscopia d'impedenza richiedono un potenziostato e un analizzatore di risposta in frequenza; per raccogliere i dati discussi nella presente Tesi si è fatto uso del macchinario Solartron 1260A (Figura 3.10) che racchiude in sé entrambe le funzioni indicate.

Il setup del banco di misura prevede alcune differenze rispetto a quello illustrato nella precedente sezione 3.2. Innanzitutto la cella viene impiegata in configurazione *a due elettrodi*, così che dei tre cavi in uscita dall'interfaccia DRP-DSC viene lasciato scollegato (*floating*) quello relativo al contro-elettrodo. La corrente fluisce pertanto tra elettrodo di lavoro ed elettrodo di pseudo-riferimento, operazione che non intacca l'accuratezza della misura fintanto che la corrente è di piccola entità o la misura veloce.

I connettori BNC femmina, che terminano i cavi connessi all'interfaccia DRP-DSC, si collegano a cavi terminati da connettori BNC maschio su entrambe le estremità (brevemente detti cavi BNC); questi realizzano il collegamento col Solartron 1260A. Più nel dettaglio l'elettrodo di lavoro è collegato al canale GEN OUTPUT dello strumento nonché, attraverso un connettore a T, all'ingresso ad alta impedenza del canale V1; analogamente l'elettrodo di pseudo-riferimento è collegato al canale INPUT dello strumento e all'ingresso a bassa impedenza del canale V1.



Figura 3.10: Lo strumento Solartron 1260A svolge entrambe le funzioni di potenziostato e analizzatore di risposta in frequenza. Nel box in basso a sinistra è riportato un connettore BNC a T.

La raccolta dei dati numerici è stata realizzata attraverso un software realizzato in ambiente LabView e sviluppato internamente al laboratorio BioDevices del Dipartimento di Ingegneria dell'Informazione dell'Università di Padova.

Prima di ogni misura di spettroscopia elettrochimica sono stati realizzati tre test di controllo:

- verifica mediante tester del bias applicato alla cella elettrochimica. A questo scopo bisogna collocare i puntali del tester in corrispondenza della bocca di inserimento del sensore nell'interfaccia DRP-DSC e contattare le piste relative agli elettrodi di lavoro e di pseudo-riferimento;
- misura di spettroscopia a vuoto (cavi BNC scollegati) per verificare l'assenza di cortocircuiti. In condizioni regolari ci si aspetta di misurare valori di impedenza in modulo dell'ordine dei  $M\Omega$ ;
- misura di spettroscopia in corto (cavi BNC cortocircuitati mediante connettore a T) per valutare il peso delle componenti parassite RLC dei cavi stessi e dello strumento.

## Capitolo 4

# Misure di caratterizzazione e modellizzazione elettrica

Le misure che presentiamo in questo e nel prossimo Capitolo hanno come scopo ultimo la rilevazione della molecola di interesse biologico NADH. Molto lavoro tuttavia è stato dedicato allo studio del liquido di coltura cellulare DMEM essendo esso, come anticipato nell'Introduzione, uno dei candidati solventi del NADH stesso. Vogliamo qui distinguere l'aspetto logico con cui le misure verranno presentate da quello cronologico con cui esse si sono succedute in laboratorio.

Sotto il profilo cronologico il primo liquido impiegato come solvente per il NADH è stato l'idrossido di sodio  $NaOH$  10 mM, comunemente noto come *soda caustica*, secondo le indicazioni di Sigma-Aldrich. Successivamente è stato impiegato il tampone fosfato salino PBS.

La scelta del tampone PBS va giustificata: da un lato è noto che il NADH si degrada più velocemente in presenza di ioni fosfato  $PO_4^{3-}$ , come già indicato in sezione 3.1.1; dall'altro il tampone PBS presenta caratteristiche interessanti:

- è un liquido isotonico, ampiamente utilizzato in biologia e fisiologia;
- è formato da appena quattro sali disciolti in acqua (Tabella 3.1), caratteristica che ne fa un liquido spesso non reattivo nei confronti di molte sostanze. Questo non è vero nel caso del NADH, ma va considerato che lo stadio finale del sensore non esclude di lavorare con una grande varietà di molecole, tutte disciolte nello stesso solvente;
- è stato appurato attraverso misure di spettroscopia d'impedenza che una prolungata esposizione a PBS altera poco la superficie degli elettrodi nei dispositivi DSC.

Alla luce di queste proprietà è stato deciso di impiegare il tampone PBS come riferimento, svolgendo in esso tutte le misure preliminari, e come tale comparirà nelle prossime pagine. Va sottolineato che la versione finale del sensore probabilmente non comprenderà diluizioni in PBS, essendo esso un tampone a pH neutro laddove alcuni passi del progetto (in particolare l'impiego dell'enzima LDH) richiedono pH alcalino.

Il passo successivo è consistito nell'impiego di DMEM come solvente per il NADH. In quanto liquido di coltura, sede delle cellule muscolari coltivate *in vitro* nonché solvente del campione biologico animale, il liquido DMEM costituisce un elemento importante nella catena di trasduzione alla base del progetto MyoScreen. Le misure in questo mezzo purtroppo si sono concluse con esito sostanzialmente negativo: non è possibile rilevare accuratamente NADH disciolto in DMEM. Per superare questo ostacolo sono state esplorate tre strade:

1. definire un modello matematico capace di descrivere, e quindi di prevedere, l'effetto del DMEM sull'esito delle misure;
2. indagare più a fondo le proprietà del DMEM e le modifiche da esso indotte a livello fisico nella cella elettrochimica, in particolare sulla superficie degli elettrodi;
3. individuare un solvente capace di sostituire il DMEM perlomeno in fase di misura.

Il punto 3. in particolare ha portato a individuare in letteratura il tampone HBRS come possibile sostituto del DMEM in fase di misura. I protocolli utilizzabili per i test sono quindi riconducibili ai seguenti:

- il protocollo standard prevede che nella coltura cellulare immersa in DMEM vengano aggiunti il campione biologico, l'enzima LDH e la forma ossidata della molecola NADH (detta  $\text{NAD}^+$  e necessaria alla catalisi enzimatica). La misura di NADH viene fatta direttamente su un campione prelevato da questa soluzione;
- il protocollo con HBRS prevede che nella coltura cellulare immersa in DMEM venga aggiunto il solo campione biologico. Una volta avviata l'espressione di lattato a livello cellulare la soluzione viene lavata via e sostituita con HBRS, al cui interno si raccoglierà il lattato che le cellule continueranno comunque ad esprimere per un certo tempo. È in questa soluzione che vengono aggiunti LDH e  $\text{NAD}^+$  e da qui sarà prelevato il campione da misurare. Come variante è possibile aggiungere il campione biologico direttamente in HBRS.

L'HBRS è stato testato ed è risultato essere compatibile con gli scopi del progetto, consentendo la rilevazione del NADH e inducendo sulla superficie degli elettrodi modifiche comparabili con quelle indotte da PBS. La Figura 4.1 riassume l'ordine cronologico delle misure.

Sotto il profilo logico le misure verranno invece raccolte per gruppi coerenti, pertanto dove possibile saranno presentati insieme i risultati relativi a PBS, DMEM e HBRS sebbene le misure siano state concepite in momenti diversi. In questo Capitolo saranno presentati i problemi riscontrati nell'uso del liquido di coltura DMEM, insieme alla modellizzazione matematica sviluppata e alle indagini spettroscopiche condotte sugli elettrodi del dispositivo. Nel prossimo Capitolo saranno invece discusse le misure più propriamente di rilevazione di NADH e le curve di calibrazione del sensore realizzate attraverso di esse.

## 4.1 Misure preliminari su matrice complessa

In questa sezione vengono presentati i problemi riscontrati nell'uso della matrice complessa DMEM. Sono assenti le misure di rilevazione di NADH in DMEM, presentate nel Capitolo 5. Tutti i test (ciclovoltammetrie) sono stati eseguiti col seguente protocollo:

- $V_{init} = 0.8V$ ;
- $V_{high} = 0.8V$ ;
- $V_{low} = -0.4V$ ;
- scan rate = 100 mV/s;
- tempo di attesa = 2 s;

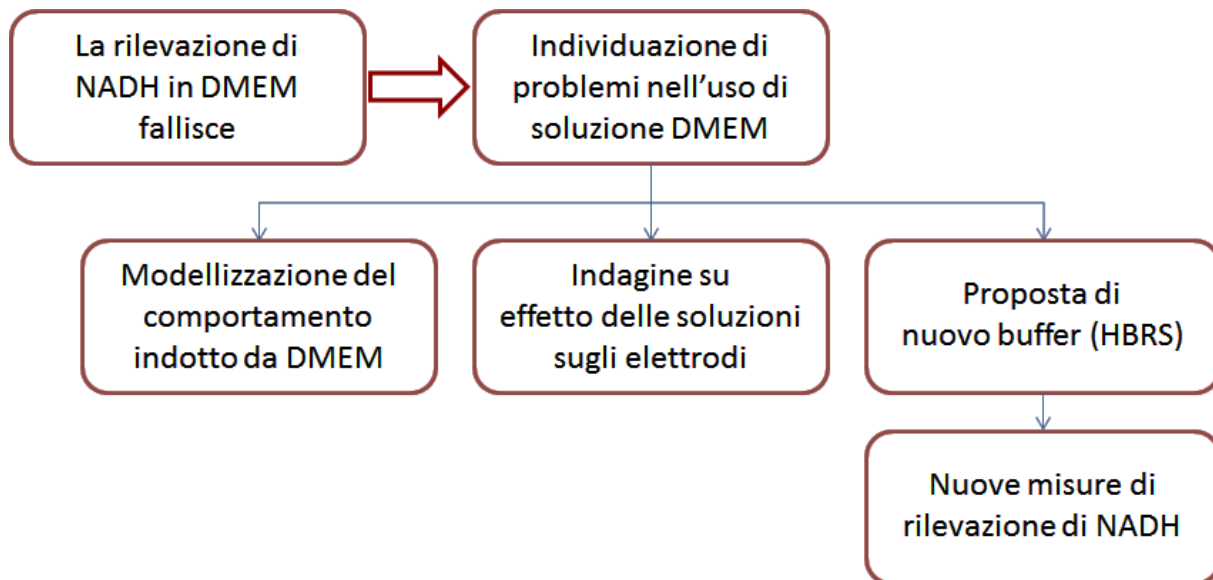


Figura 4.1: Successione cronologica delle misure svolte.

- intervallo di campionamento in ascissa pari a 1 mV. Va segnalato che il software di controllo dello strumento può decidere di incrementare in automatico tale valore in caso di misure particolarmente lunghe o per valori di scan rate troppo elevati, per non entrare in conflitto coi tempi di elaborazione;
- dispositivo DSC (DropSens Carbon DRP110);
- volume della goccia deposta = 100  $\mu\text{l}$ .

Questo protocollo verrà designato come *protocollo A* da qui in avanti per distinguerlo da un secondo, impiegato nelle misure descritte nel Capitolo 5. Diamo ora una giustificazione dei valori scelti.

Nell'eseguire una qualsiasi ciclovoltammeteria su soluzione a base acquosa bisogna sempre considerare che per valori di tensione intorno a 1.23 V (rispetto a riferimento SHE) si innesca il processo di elettrolisi dell'acqua; di fatto nessun test supererà questa soglia, che nel caso di riferimenti diversi dallo SHE si assesterà peraltro su valori di tensione inferiori. Va inoltre considerato che il NADH, obiettivo ultimo delle misure presentate in questa Tesi, si ossida per valori tra 0.47 V e 0.59 V nella cella DSC. Alla luce di questi riferimenti è stato deciso di porre  $V_{high} = 0.8$  V.

Il valore di  $V_{low}$  invece è stato scelto per simmetria: nei test con ferricianuro il picco di ossidazione si colloca intorno a 0.2 V in cella DSC, circa a metà tra 0.8 V e -0.4 V; la simmetria non è più vera nel caso del picco di riduzione, ma le curve riescono comunque ad entrare nella regione a controllo diffusivo, così che i due picchi risultano essere ben definiti.

Il valore di  $V_{init}$  è stato imposto arbitrariamente; in questa fase delle misure, in cui il NADH è assente, non si è sentita l'esigenza di imporre valori specifici. Nel Capitolo 5 proprio questo valore sarà alla base di un nuovo protocollo (denominato *protocollo B*), per il quale si darà giustificazione in quella sede.

Il valore di scan rate è dell'ordine di grandezza comunemente impiegato per test ciclovoltammetrici di questo tipo e garantisce un buon compromesso tra l'intervallo di tensione  $V_{low}-V_{high}$  da coprire e la durata del test (24 secondi per ogni ciclo).

Il valore del tempo di attesa è stato scelto per consentire alla soluzione deposta di raggiungere uno stato di equilibrio, senza eventuali moti interni dettati dall'uso della pipettatrice con cui il campione viene posizionato su DSC.

Infine è bene sottolineare che le misure presentate sono state spesso affette da un rumore ad alta frequenza, sovrapposto al segnale utile, con ampiezza picco-picco dell'ordine di  $\sim 10^2$  nA. Per pulire le tracce si è applicata un'operazione di filtraggio elementare consistente nella media mobile di ordine 2, implementata attraverso la funzione Matlab:

```
tsmovavg(tsobj, 's', 2, dim)
```

per la quale si rimanda alla guida in linea del software. La Figura 4.2 mostra una traccia ciclovoltammetrica prima e dopo l'operazione di filtraggio.

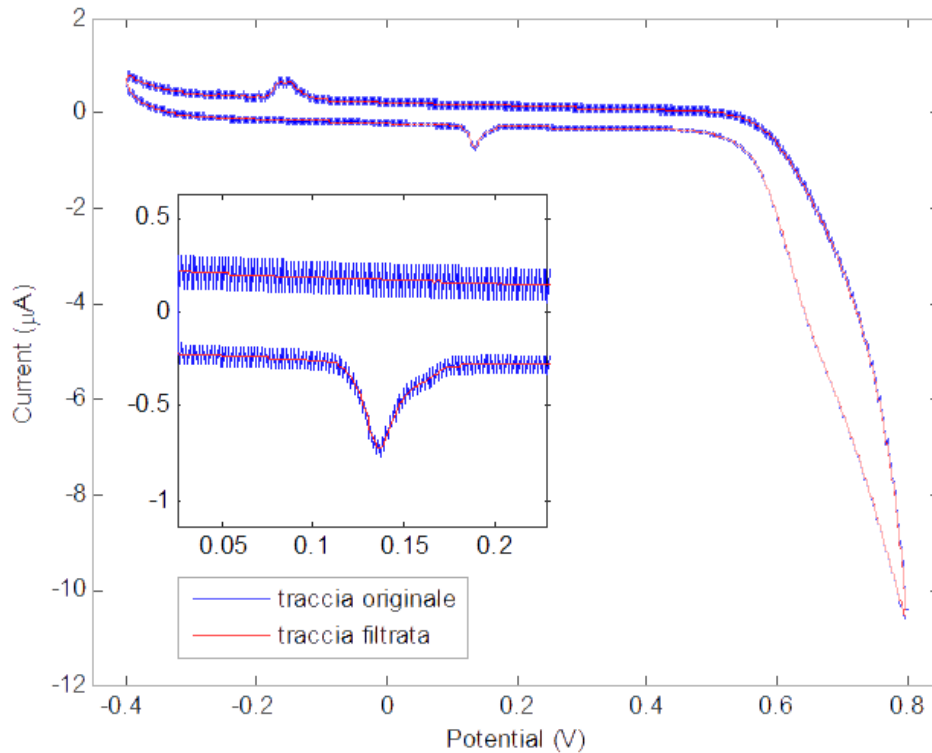


Figura 4.2: Traccia ciclovoltammetrica di DMEM con filtraggio a media mobile. Protocollo A, 1 ciclo su dispositivo usato.

## 4.1.1 Mancanza di assestamento della traccia ciclovoltammetrica

### 4.1.1.1 Misure consecutive su dispositivo

Il primo indizio di problemi nell'utilizzo di DMEM con sensori DSC è arrivato da un test di ciclovoltammetria su DMEM puro. Il test è stato eseguito seguendo questa procedura: 75 cicli di ciclovoltammetria realizzati con protocollo A e spezzati in 5 ripetizioni consecutive di 15 cicli ciascuna. Tra una ripetizione e la successiva il dispositivo è stato lavato e asciugato, e una nuova goccia di DMEM deposta. L'intera procedura è stata applicata in totale su 2 dispositivi DSC nuovi. Questa misura verrà indicata per brevità come *test 5x15*.

La Figura 4.3 fornisce una panoramica delle tracce ciclovoltammetriche misurate. La presenza di correnti di ossidazione nel DMEM non deve stupire: in esso sono disciolte numerose molecole organiche (Tabella 3.2), specie vitaminiche, che esibiscono un comportamento redox. Non bisogna inoltre dare un peso negativo all'ampiezza delle barre d'errore



del ciclo 1 intorno a 0.5 V: per gradi pendenze della traccia è sufficiente un piccolo spostamento in ascissa per determinare una grande variazione lungo le ordinate.

Appare evidente la mancanza di assestamento delle curve (fenomeno di *drift* delle trac-

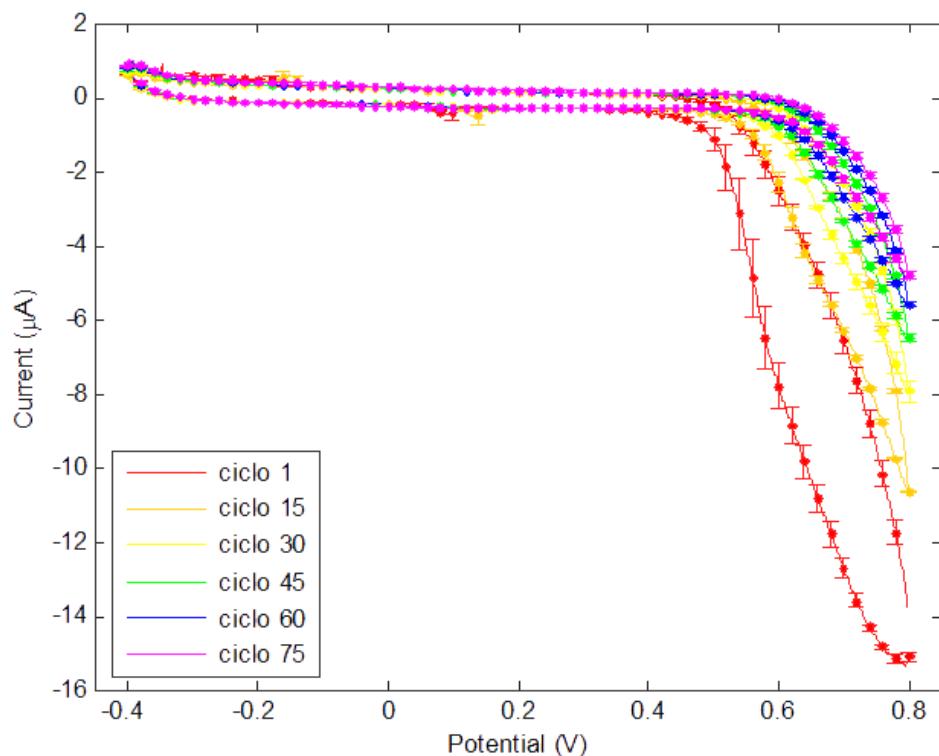


Figura 4.3: Ciclovoltammometria 5x15 su DMEM, selezione delle tracce misurate. Valori medi su 2 dispositivi. Sottolineiamo che il picco a 0.8 V non è un vero picco di ossidazione ed è dovuto unicamente al fatto di aver raggiunto  $V_{high}$ , così che si inverte la pendenza del segnale di ingresso; la regione a controllo diffusivo non viene raggiunta per 0.8 V (se non durante i primissimi cicli che mostrano un minimo a 0.798 V circa). Detto altrimenti i segmenti di curva nell'intervallo 0.4 V  $\div$  0.8 V sono monotoni calanti.

ce ciclovoltammetriche). Si potrebbe essere indotti a incolpare l'intervallo di potenziale scelto: il picco di riduzione è assente, pertanto il processo avanza in una sola direzione consumando specie ridotte senza rigenerarle, così che la corrente misurata cala in modulo a ogni ciclo. Se così fosse il problema sarebbe da ricondurre unicamente al cambio di composizione della soluzione. L'osservazione fatta è sicuramente valida, tuttavia la Figura 4.4 rende evidente che l'origine del problema è da ricercare altrove.

La Figura mostra l'andamento dei minimi assoluti di corrente per tutti e 75 i cicli svolti, con colori diversi per ciascuna delle 5 ripetizioni. Se veramente la deriva delle tracce fosse da imputare unicamente a un cambiamento nella composizione della soluzione, ripristinare la soluzione al suo stato originale (operazione effettuata lavando il dispositivo e applicando una nuova goccia di DMEM) dovrebbe azzerare l'intero sistema elettrochimico, così che ad ogni ripetizione ci si troverebbe a ciclare sulle stesse prime 15 tracce. Il concetto è espresso graficamente in Figura 4.4 attraverso le tracce nere. Il fatto che la deriva non si arresti, e anzi prosegua all'incirca dagli stessi valori raggiunti dalla iterazione precedente, ci comunica che è avvenuto un cambiamento che permane nonostante il lavaggio del dispositivo. L'unico elemento che non varia tra una ripetizione e l'altra è il dispositivo stesso: questo ci spinge a sospettare che il DMEM alteri, forse in modo permanente, la superficie del sensore e quindi degli elettrodi.

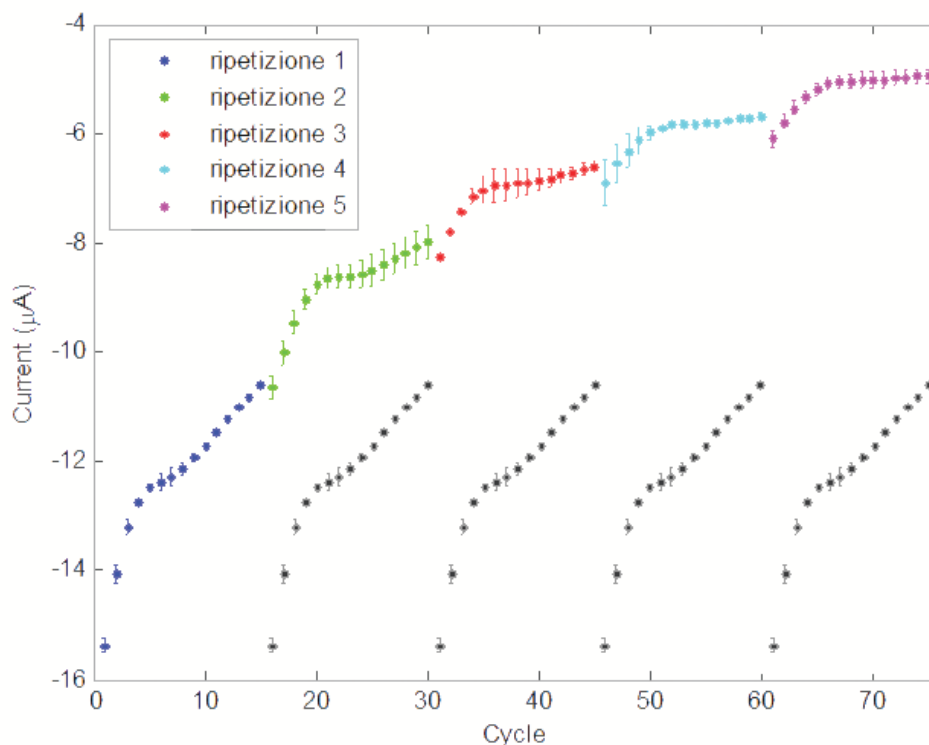


Figura 4.4: Ciclovoltammetria 5x15 su DMEM, minimi assoluti di corrente. In nero sono riportati, opportunamente traslati in ascissa, i valori misurati durante l'iterazione 1 (punti blu); il loro scopo è solo concettuale, ovvero esprime graficamente l'andamento atteso qualora le modifiche del sistema fossero confinate alla soluzione, senza alcun effetto sulla superficie degli elettrodi.

Le misure presentate nelle prossime sezioni 4.1.1.2 e 4.1.2 forniranno ulteriori elementi a sostegno di questa ipotesi.

#### 4.1.1.2 Misure prolungate su dispositivo

Il test che presentiamo è stato eseguito seguendo questa procedura: 75 cicli ininterrotti di ciclovoltammetria realizzati con protocollo A su un dispositivo DSC; la procedura è stata applicata in totale su 2 dispositivi nuovi. Questa misura verrà indicata per brevità come *test prolungato*. Va segnalato, per sottolineare gli imprevisti che si incontrano lavorando con matrici complesse, che il test era stato originariamente svolto su 4 DSC in due giornate diverse (2 dispositivi al giorno), ma il secondo gruppo di 2 è stato escluso a posteriori dall'analisi quando ci si è accorti che il DMEM impiegato si era alcalinizzato. In effetti è stato proprio quest'episodio a portarci a indagare meglio la questione del pH nel DMEM. La Figura 4.5 mostra tutti i 75 cicli per il primo dei 2 dispositivi testati; lo scopo è unicamente visualizzare l'andamento generale delle curve misurate. Le tracce sono presentate dalla 1 alla 75 con codifica a colore seguendo lo spettro del visibile: dal rosso al viola passando per giallo, verde e blu; questa sarà indicata da qui in avanti come *codifica a spettro* per brevità. Per una visione d'insieme di entrambi i test svolti si rimanda alla Figura 4.6, dove sono presentati valori medi e deviazioni standard per una selezione dei 75 cicli.

La prima osservazione da fare sui dati proposti riguarda ancora una volta la mancanza di assestamento delle tracce ciclovoltammetriche, persino dopo 75 cicli. Si segnala che in questo caso la goccia di campione impiegata è unica per tutta la durata del test, pertan-

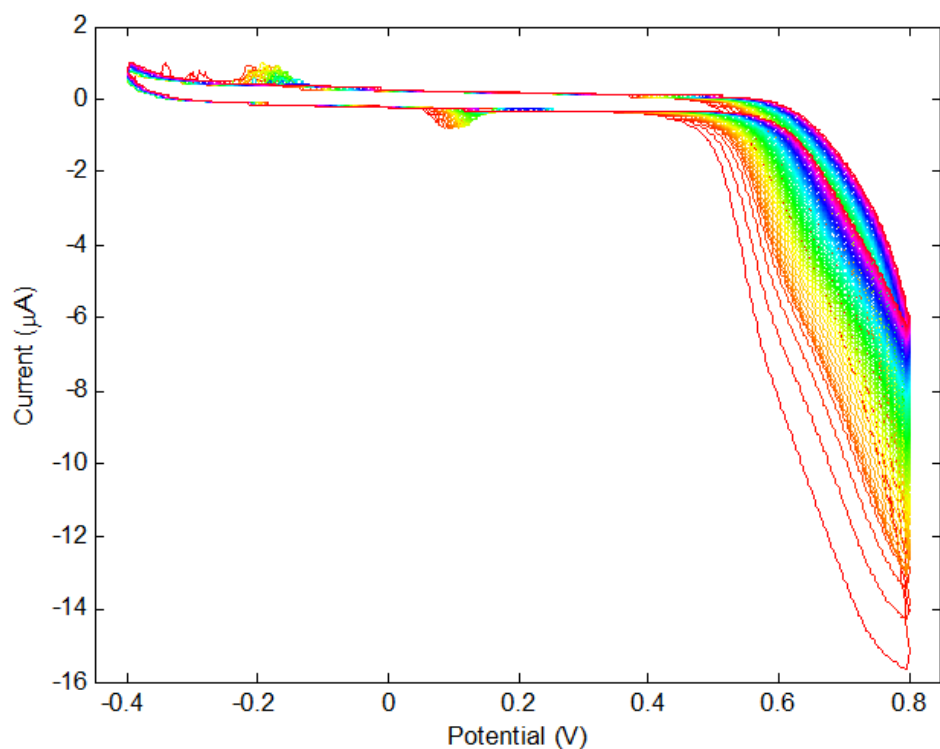


Figura 4.5: Ciclovoltammetria, 75 cicli su DMEM. Codifica colori a spettro.

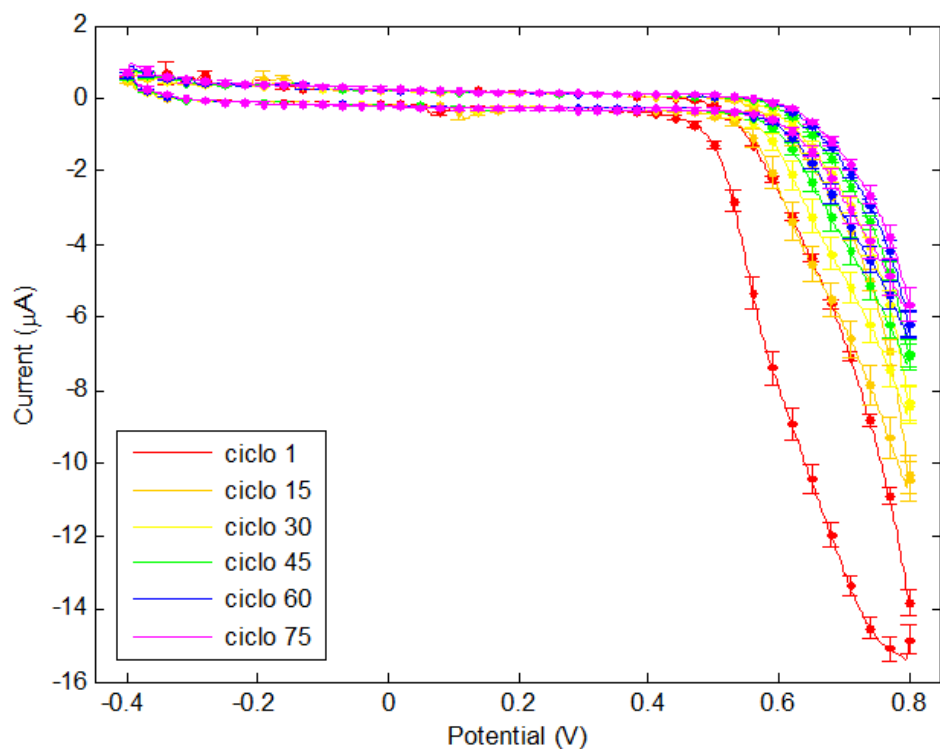


Figura 4.6: Ciclovoltammetria, 75 cicli su DMEM. Selezione delle tracce misurate. Valori medi su 2 dispositivi.

to la mancanza di un picco di riduzione si fa sentire maggiormente; tuttavia è possibile estrarre un'informazione più interessante andando a considerare i minimi assoluti intorno

a 0.8 V, come fatto in sezione 4.1.1.1, e confrontandoli per l'appunto con quei dati. La Figura 4.7 presenta il confronto tra i dati dei due test.

Possiamo fare alcune osservazioni:

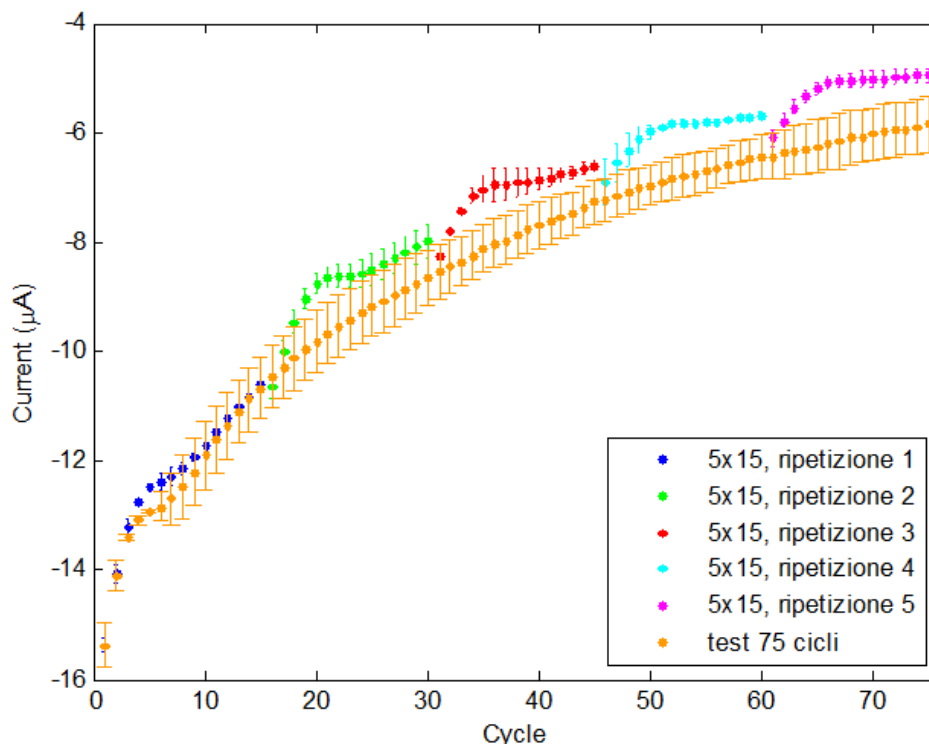


Figura 4.7: Ciclovoltammetria su DMEM, minimi assoluti di corrente. Confronto tra i risultati ottenuti nel test 5x15 e quelli estratti dal test riportato nella presente sezione.

- le barre di errore sono molto ampie: le due curve che le generano divergono dal ciclo 6, seppure da lì procedano parallele; non è chiara l'origine di questa divergenza. Pesa sicuramente sul risultato il numero esiguo di dispositivi testati: misure simili prodotte in altro momento e lavorando su più dispositivi hanno mostrato barre d'errore più contenute. Tali altre misure non sono qui riportate perché prodotte impiegando un protocollo differente;
- è palese che i dati raccolti nel test 5x15 seguono l'andamento tracciato dal test prolungato. Se l'andamento è quello indicato, indipendentemente dal fatto che la goccia di campione sia o no periodicamente rinnovata, riceve forza l'ipotesi che sia in corso una modifica alla superficie degli elettrodi.

#### 4.1.2 Misure su soluzioni alternate a pari dispositivo

Il test introdotto in questa sezione è stato eseguito secondo questa procedura: 40 cicli di ciclovoltammetria realizzati con protocollo A e suddivisi in 10 ripetizioni da 4 cicli, ciascuna separata dalle altre da un'operazione di lavaggio e asciugatura del DSC e deposizione di una nuova goccia di campione. Le prime 2 ripetizioni (8 cicli) sono state eseguite alternando sul dispositivo 2 gocce di ferricianuro 5 mM disciolto in PBS; le successive 2 ripetizioni hanno impiegato ferricianuro 5 mM in DMEM, cui sono seguite altre 2 con ferricianuro 5 mM in PBS e così via, alternando le soluzioni ogni 2 ripetizioni fino alla fine. L'intera misura è stata ripetuta identica su un secondo dispositivo DSC non usato.

Lo scopo del test è confrontare la risposta dell'elettrodo ai due solventi; il fatto che le ripetizioni siano alternate a gruppi di 2 serve a riprodurre nel contempo il test presentato nella precedente sezione 4.1.1.1. La scelta di ferricianuro si giustifica secondo due motivi:

- il ferricianuro presenta un picco ben definito a bassi valori di potenziale, facile da rilevare. Bisogna sempre considerare che più bassi sono i valori di potenziale ai quali si osserva un fenomeno e meno probabile è la presenza di interferenti;
- il ferricianuro è una sostanza di interesse per il progetto MyoScreen. Una delle possibili vie per la rilevazione di acido lattico consiste infatti in una doppia catena di trasduzione, da lattato a NADH e da NADH a ferrocianuro; l'ultimo passaggio coinvolge il ferricianuro come reagente, in un ruolo detto di *mediatore redox*. Questa tematica non viene trattata nella presente Tesi.

In Figura 4.8 e 4.9 riportiamo l'insieme completo delle misure (tutte le tracce divise per solvente) per il primo dei due dispositivi testati, allo scopo di inquadrarne visivamente l'andamento generale. In Figura 4.10 sono riportati i valori dei minimi assoluti (picco di ossidazione del ferricianuro) per tutte le ripetizioni di entrambi i dispositivi testati.

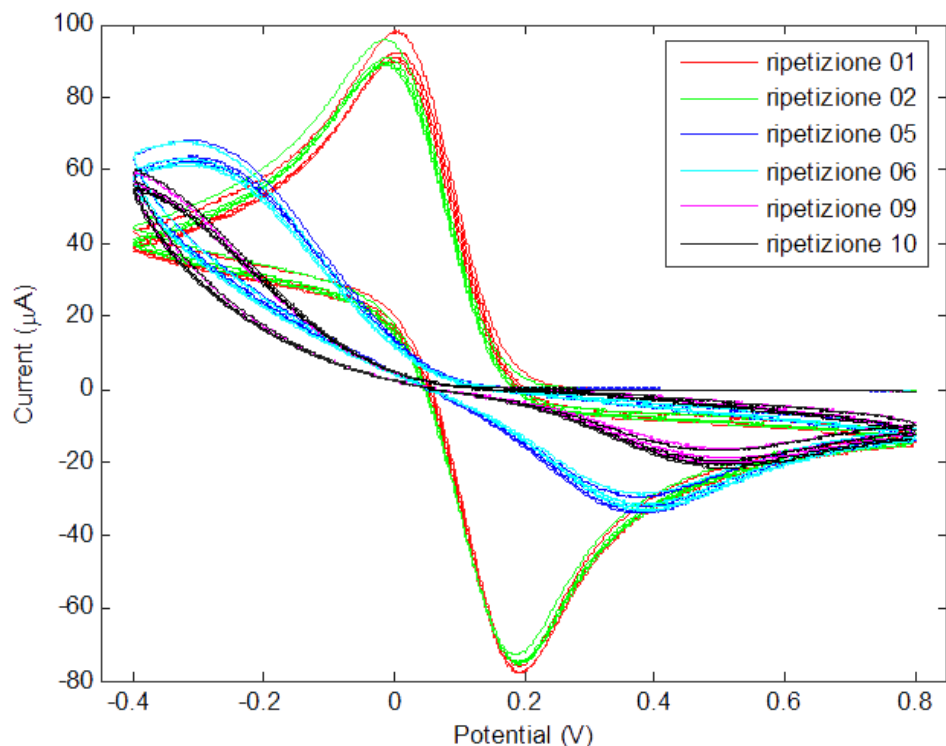


Figura 4.8: Ferricianuro 5 mM, sole ripetizioni in PBS. Le ripetizioni 01 e 02 sono state effettuate in successione su dispositivo DSC nuovo. Le ripetizioni 05 e 06 succedono a 4 ripetizioni di cui 2 in DMEM; le ripetizioni 09 e 10 succedono a 8 ripetizioni di cui 4 in DMEM.

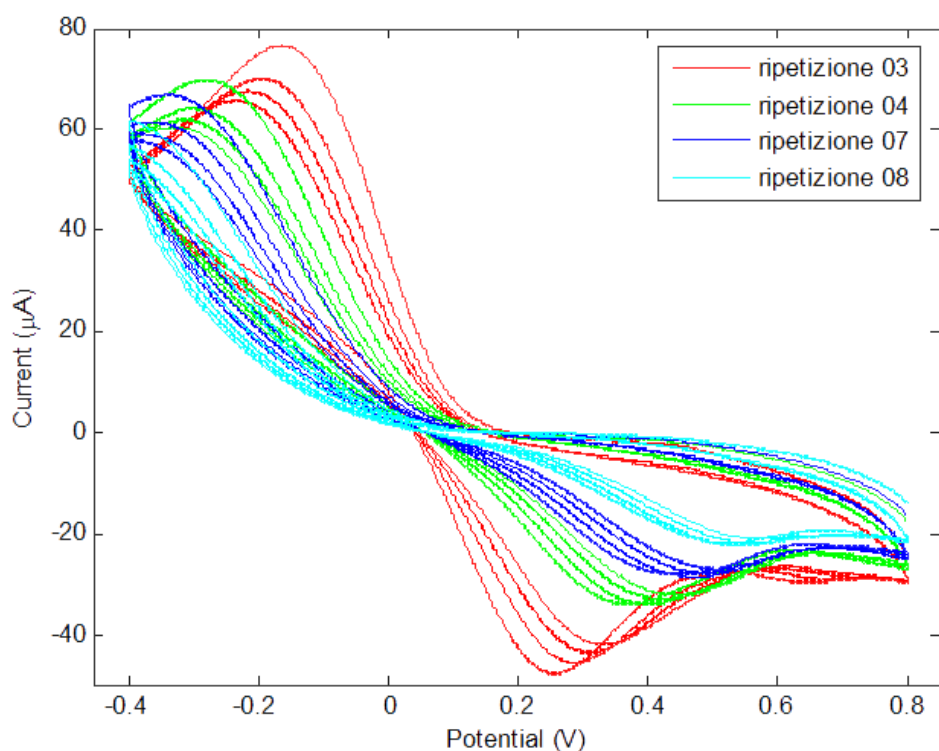


Figura 4.9: Ferricianuro 5 mM, sole ripetizioni in DMEM. Le ripetizioni 03 e 04 sono consecutive, come anche le ripetizioni 07 e 08. Le tracce ciclovoltammetriche mostrano un drift continuo, particolarmente visibile nello spostamento del picco di ossidazione (minimi assoluti).

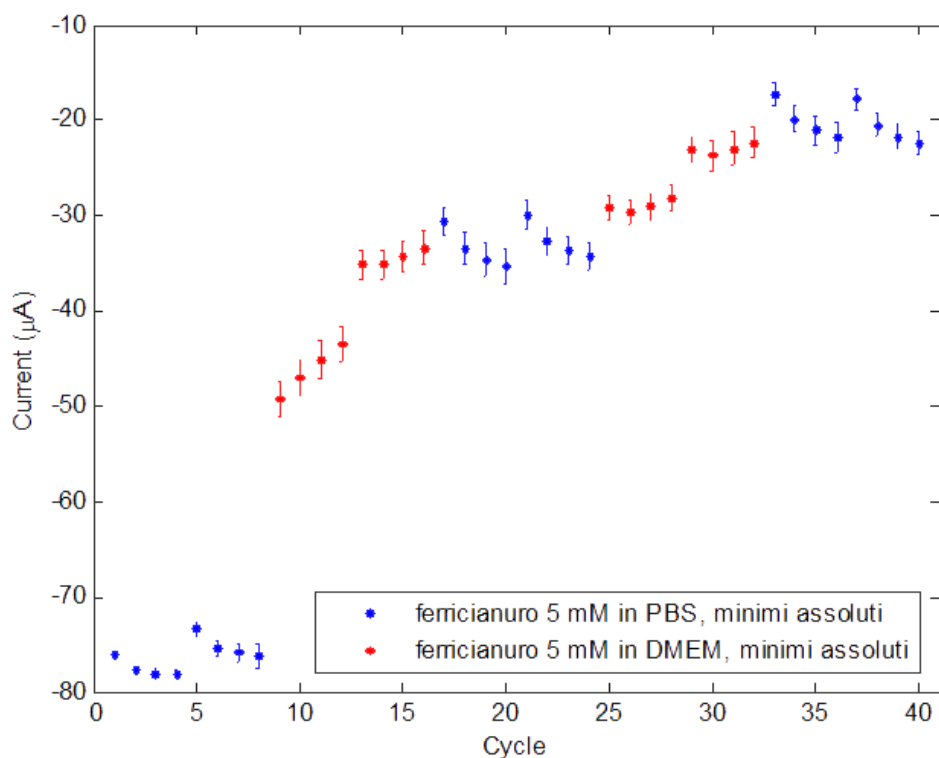


Figura 4.10: Ferricianuro 5 mM diluito in PBS e DMEM, valori di corrente del picco di ossidazione.

È immediato osservare come le misure in PBS mantengano un ottimo grado di riproducibilità tra ripetizioni consecutive (01 e 02, 05 e 06, 09 e 10), elemento tanto più interessante per il fatto che le misure sono svolte sempre sullo stesso dispositivo. Questo fatto non è irrilevante: in un dispositivo già usato è sempre lecito aspettarsi variazioni nelle misure indotte dalla storia pregressa; detto altrimenti, la ripetizione 06 vede un dispositivo diverso da quello visto dalla ripetizione 05, proprio per il fatto che la ripetizione 05 è stata misurata su di esso. Il fatto che comunque le ripetizioni consecutive siano ben riproducibili ci informa che il PBS è poco aggressivo nei confronti degli elettrodi.

Per le misure in DMEM si ripresenta invece il problema del drift già evidenziato nei precedenti esperimenti. Questo problema peraltro è alla base della decisione di studiare i soli valori del picco di ossidazione (Figura 4.10): il picco di riduzione si sposta fino a uscire (ripetizione 07) al di fuori della finestra di osservazione in tensione, e se una curva di riduzione non esibisce la regione a controllo diffusivo non è possibile definire alcun picco. Si sarebbe potuto ripetere il test utilizzando una finestra in potenziale più ampia, tuttavia questo avrebbe reso più complicato il confronto dei dati tra esperimenti diversi; si è deciso pertanto di mantenere il protocollo A.

La prima considerazione che possiamo fare riguarda il drift in potenziale dei valori di picco per le curve di ferricianuro in DMEM (Figura 4.9). Negli esperimenti di sezione 4.1.1 i valori presi a riferimento erano quelli di minimo assoluto individuati tra 798 mV e 800 mV: di fatto l'unico drift osservabile era in ordinata e riguardava i valori di corrente. In questo esperimento invece è possibile individuare un drift tanto in ascissa quanto in ordinata, cosa che ci consente di fare qualche osservazione in più. Due sono le possibili spiegazioni per il drift in tensione:

- l'impiego di uno pseudo-elettrodo come elemento di riferimento nella cella elettrochimica DRP110. Un elettrodo di riferimento, come detto in sezione 1.3.3, mantiene una caduta di potenziale rispetto alla soluzione che è funzione dello stato del sistema elettrochimico. Una misura lenta, o tale che la composizione della soluzione cambi radicalmente durante il test, può alterare il valore di tensione dello pseudo-riferimento rispetto all'elettrodo SHE. Questo scenario non è verosimile nel caso del nostro esperimento:
  - le misure sono veloci, appena 4 cicli;
  - il drift prosegue nonostante la soluzione sia rinnovata spesso, lavando il dispositivo e deponendo una nuova goccia di ferricianuro 5 mM in soluzione;
  - nelle misure in PBS non si rileva alcun drift in tensione tra ripetizioni consecutive;
  - il drift in tensione è enorme (per un sistema elettrochimico): centinaia di millivolt. Lo stato della cella dovrebbe cambiare radicalmente per giustificare valori di drift così alti.
- il DMEM altera la superficie degli elettrodi, o degradandoli o determinando l'adsorbimento di sostanze sulla loro superficie.

La seconda considerazione da fare riguarda l'andamento dei minimi assoluti presentato in Figura 4.10 e quindi il rapporto tra PBS e DMEM. Come già osservato nelle Figure 4.8 e 4.9 le curve di ferricianuro in PBS tendono a mantenere inalterato l'andamento tra ripetizioni successive, laddove le misure in DMEM non accennano invece a stabilizzarsi; i valori dei minimi riflettono questa tendenza. Il grafico consente inoltre di apprezzare un secondo elemento: i valori rilevati usando PBS come solvente (punti blu di Figura 4.10) tendono a spostarsi in un intorno degli ultimi valori raggiunti nell'ultima ripetizione di

ferricianuro in DMEM (punti rossi): il DMEM detta lo stato dell'elettrodo, il PBS vi si adegua. Detto altrimenti DMEM e PBS presentano un diverso grado di aggressività nei confronti degli elettrodi, il primo alterandone la superficie e il secondo lasciandoli sostanzialmente inalterati. Il concetto è reso più evidente dalla Figura 4.11, che presenta tutte le ripetizioni in ordine di acquisizione, divise in 4 gruppi per agevolare la spiegazione che segue; di nuovo si riportano le curve solamente del primo dei 2 dispositivi testati, e con la stessa motivazione presentata sopra. La Figura consente di apprezzare che le curve di ferricianuro in DMEM si spostano rispetto alle precedenti curve in PBS (grafici di sinistra), laddove le curve in PBS tendono a seguire l'andamento dettato dall'ultima ripetizione in DMEM (grafici di destra), e questo è valido in generale e non solo per i valori del picco di ossidazione.

Concludiamo questa sezione sottolineando che è impossibile, in questa fase dello studio, discriminare il tipo di alterazione degli elettrodi indotta da DMEM, ovvero degradazione fisica della superficie oppure adsorbimento di molecole alla superficie; confermare o smentire un'eventuale degradazione fisica dello stato degli elettrodi avrebbe richiesto uno studio con macchinari di microscopia atomica che non è stato possibile realizzare. Possiamo tuttavia anticipare i risultati della sezione 4.3 e affermare che le indagini di spettroscopia d'impedenza fanno propendere per la seconda ipotesi: l'adsorbimento agli elettrodi di sostanze diluite nel DMEM. La natura scabra della superficie degli elettrodi (Figura 1.7) è coerente con questo scenario.



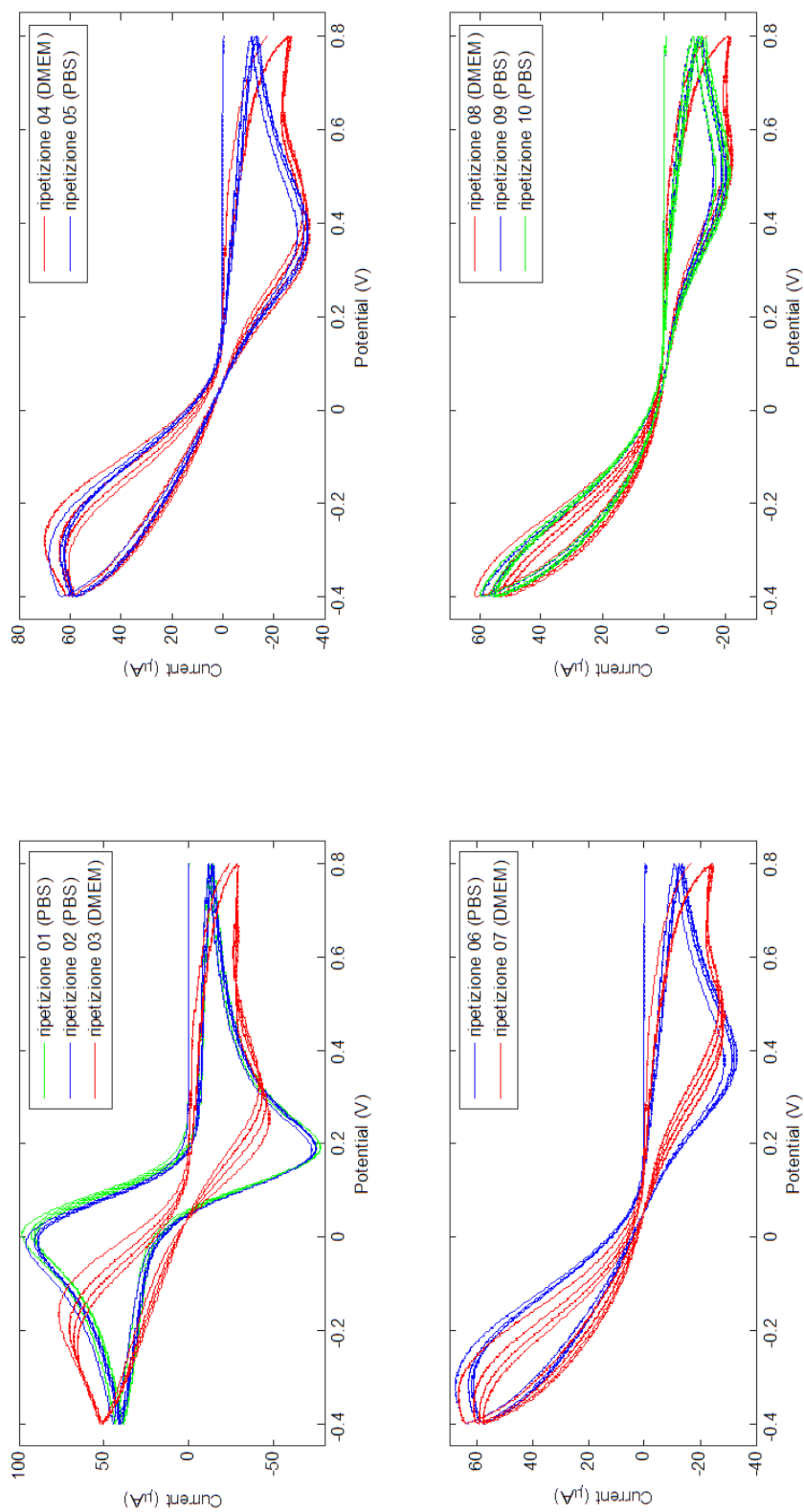


Figura 4.1.1: Ferricianuro 5 mM diluito in PBS e DMEM, tutte le ripetizioni

## 4.2 Modellizzazione della deriva indotta da matrice complessa

Abbiamo osservato nelle precedenti sezioni che il DMEM induce un drift delle tracce ciclovoltammetriche nel caso in cui lo stesso dispositivo sia impiegato per più di una misura, oppure per una sola misura ma formata da più cicli consecutivi. Abbiamo anche discusso il fatto che questo drift ha almeno due componenti:

- la degradazione della superficie dell'elettrodo, verosimilmente indotta da adsorbimento di molecole all'elettrodo (acqua e sostanze organiche). Questo fenomeno è quello di maggior rilievo;
- per misure prolungate, l'assenza di un picco di riduzione così che le specie redox responsabili del segnale di corrente di ossidazione vengono via via consumate e non ripristinate;

Una possibile componente infine è dettata dall'uso di un elettrodo di pseudo-riferimento sulla cui stabilità nel lungo periodo non sono state svolte indagini. Si consideri che una misura di ciclovoltammetria da 75 cicli realizzata con protocollo A impiega ben 30 minuti a concludersi.

In questa sezione mostriamo come sia possibile modellizzare il drift complessivo delle tracce ciclovoltammetriche, evidenziando che si tratta di uno studio preliminare; la versione commerciale del sensore potrebbe non necessitarne. Vogliamo inoltre spendere un paio di righe per chiarire come interpretare i risultati di questa operazione di modellizzazione: nelle pagine che seguono noi definiamo un approccio, un metodo, più che fornire risultati numerici sempre validi. Il problema nasce dal fatto che il drift è funzione tanto della soluzione quanto della superficie del dispositivo.

La prima può variare: in letteratura si possono riscontrare soluzioni diverse tutte etichettate come DMEM e che differiscono per poche sostanze oppure per la concentrazione delle stesse sostanze; anche per questo motivo è stata nostra cura riportare la composizione esatta della soluzione DMEM da noi impiegata (Tabella 3.2).

La seconda è funzione del materiale impiegato per gli elettrodi nonché della tecnica costruttiva con cui tali materiali sono depositi. Per finire anche il protocollo di misura ha il suo peso: un valore di scan rate maggiore ad esempio determina una minore esposizione degli elettrodi a DMEM a pari numero di cicli e quindi un minore degrado della superficie del sensore (Figura 4.12).

Riassumendo, in questa sezione vogliamo mostrare attraverso lo studio di pochi dispositivi DSC che la modellizzazione è possibile, senza la pretesa di fornire risultati numerici sempre validi; qualora questa modellizzazione si rendesse necessaria (ai fini della commercializzazione del sensore) sarà compito del gruppo di ricerca, in quel momento, realizzare uno studio su una numerosità campionaria maggiore finalizzato a definire dei valori di riferimento per il modello in funzione dell'esatto protocollo impiegato. Per lo stesso motivo è stato scelto di mostrare valori e interpolazioni (*fit*) caso per caso, relativamente ai singoli dispositivi testati, piuttosto che interpolare i valori medi; in questo modo è possibile evidenziare meglio la sovrapposizione tra dati e curva interpolante e quindi la bontà del modello.

Per le analisi riportate in questa sezione ci riferiremo a diverse tipologie di misure, tutte realizzate con protocollo A: misure su DMEM puro, misure su ferricianuro disciolto in DMEM, misure su ferricianuro disciolto in una miscela di PBS e DMEM.

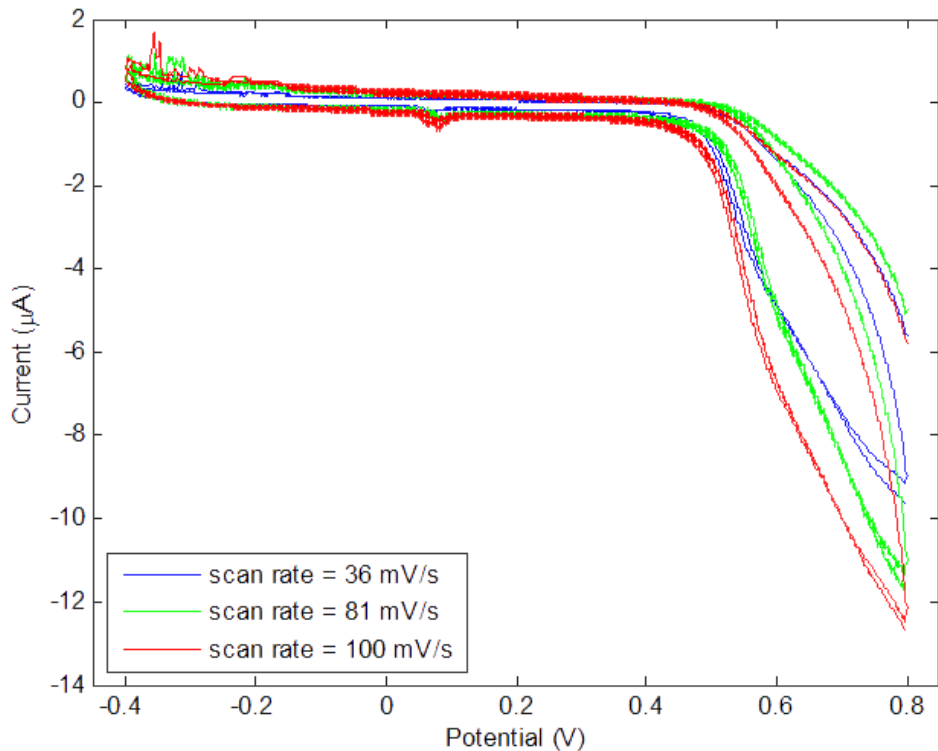


Figura 4.12: Misure su DMEM puro per diversi valori di scan rate. Test eseguito con protocollo A, 2 cicli per ogni dispositivo, un dispositivo nuovo per ogni valore di scan rate.

#### 4.2.1 Analisi di misure su pura matrice complessa

In questa sezione si analizzano misure realizzate su DMEM puro con protocollo A, 75 cicli. Il test è stato svolto su 2 DSC nuovi qui indicati come DSC7 e DSC8. Le misure sono state già introdotte in precedenza in sezione 4.1.1.2 (Figure 4.5 e 4.6). Per fornire una descrizione del drift si rende ora necessario individuare dei set di punti significativi, descrittivi del fenomeno; ne sono stati individuati 3:

- dataset A: valori di tensione in corrispondenza del minimo locale intorno a 0.1 V. È stato osservato, anche su altri test qui non riportati, che per tale minimo i valori di tensione tendono ad essere più riproducibili dei corrispondenti valori di corrente;
- dataset B: valori di tensione lungo le curve di ossidazione in corrispondenza dell'ascissa di valore  $-5 \mu A$ .
- dataset C: valori di corrente nel minimo assoluto intorno a 0.8 V;

Un'osservazione sul terzo set di dati. Nelle misure di ciclo voltammetria viene campionato l'ingresso, quindi il segnale di tensione, con un passo di  $p$  mV; in corrispondenza di ciascun valore in ascissa viene misurato un valore di corrente in ordinata. Ne consegue che sezionare la traccia ciclo voltammetrica a  $-5 \mu A$  non interseca necessariamente valori del ciclo voltammogramma; la Figura 4.13 riassume graficamente la questione. Nei nostri esperimenti questo fatto non costituisce un problema essendo il passo di campionamento  $p$  molto piccolo, tipicamente 1 mV (o 2 mV in alcuni casi rari). Qualora non fosse questo il caso diventa necessario definire come scegliere i valori di tensione. Sono possibili almeno due vie:

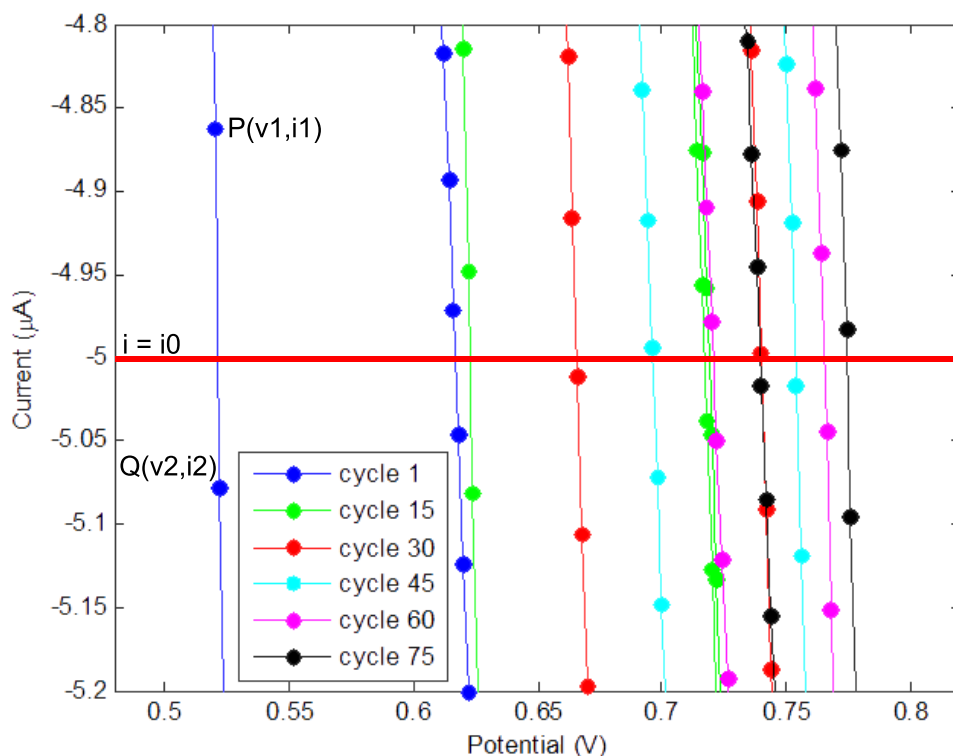


Figura 4.13: Sezione orizzontale (linea rossa) di un insieme di tracce ciclovoltammetriche. La linea di sezione non interseca necessariamente i punti misurati.

- prendere il valore di corrente misurata più vicino a quello di interesse e registrare il valore di tensione corrispondente. Nelle analisi che seguiranno è stata impiegata questa strada;
- interpolare linearmente la curva tra i due valori di corrente misurata più vicini a quello di interesse, quindi i valori immediatamente sopra e immediatamente sotto alla sezione; valutare l'intersezione tra la retta interpolante e la sezione, registrare il valore di tensione corrispondente. Siano  $P(v_1, i_1)$  e  $Q(v_2, i_2)$  i due punti in questione con  $v_1 < v_2$  e  $i = i_0$  il valore di sezione; è banale verificare attraverso la geometria analitica che il valore di tensione cercato è allora pari a:

$$(4.1) \quad v = \frac{v_2 - v_1}{i_2 - i_1} (i_0 - i_1) + v_1$$

La Figura 4.14 mostra per il dispositivo DSC7 la porzione delle tracce ciclovoltammetriche dalla quale vengono estratti i valori del dataset A; al solito lo scopo è consentire di inquadrare l'andamento delle curve. La Figura 4.15 mostra i valori del dataset A ricavati dalle curve, distinti per DSC7 e DSC8. I valori di Figura 4.15 presentano un andamento non stocastico, un'osservazione che ci conforta. Si noti l'assenza di valori per DSC7 oltre il ciclo 70: il motivo risiede in una progressiva diminuzione del picco di ossidazione, che gradatamente sfuma in un semplice rigonfiamento di una traccia ora monotona. Ci proponiamo di cercare un modello matematico che descriva questo andamento con un numero contenuto di parametri. La legge esponenziale:

$$(4.2) \quad y = ae^{bx}$$

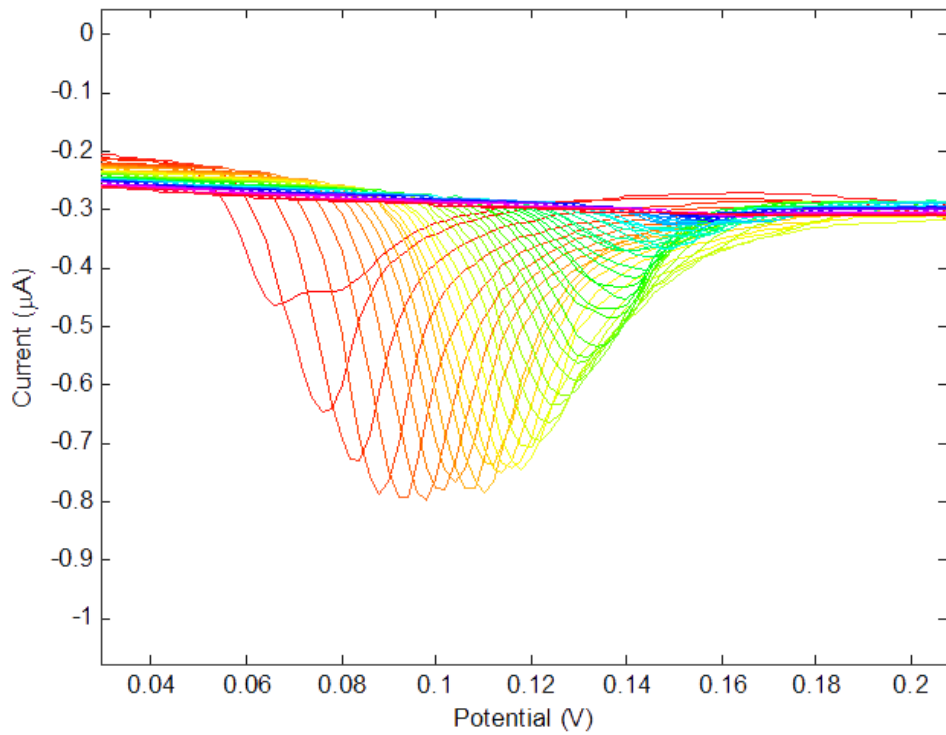


Figura 4.14: Ciclovoltammetria su DMEM, 75 cicli, DSC7. Particolare delle tracce ciclovoltammetriche. Codifica colori a spettro.

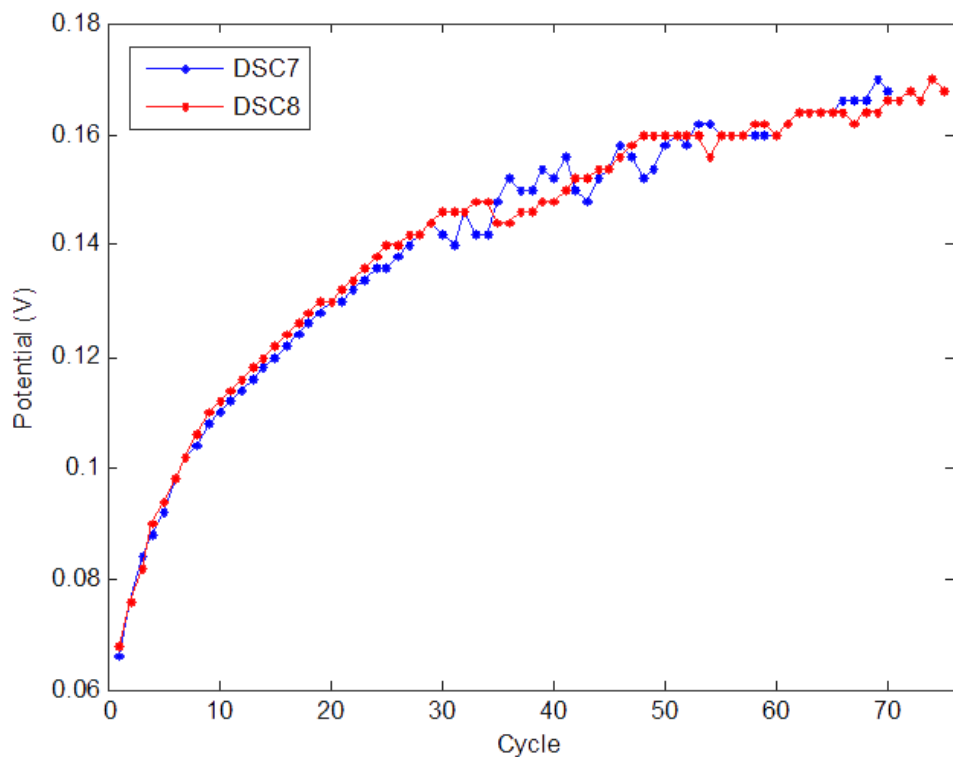


Figura 4.15: Ciclovoltammetria su DMEM, 75 cicli. Dataset A: dati misurati.

risulta inadatta a interpolare una curva dall'andamento concavo come quella riportata in Figura; la somma di 2 esponenziali vi riesce, ma fa uso di ben 4 parametri di fit. Inter-

polazioni polinomiali presentano valori del *coefficiente di determinazione*  $R^2$  comparabili con quello della somma di esponenziali solo per grado maggiore o uguale a 4: di nuovo, troppi parametri.

Un modello applicabile risulta essere la legge di potenza, definita dall'equazione:

$$(4.3) \quad y = p x^q + r$$

che ha il pregio di fare uso di soli 3 parametri. Il significato pratico dei parametri è immediato dall'analisi della funzione: il parametro  $r$  è l'intercetta all'origine (parametro di shift verticale), il parametro  $p$  comprime o dilata in verticale la curva interpolante; il parametro  $q$  definisce il grado della potenza. Questa legge ha il pregio di interpolare bene la regione iniziale del dataset, ovvero i valori riferiti ai cicli 1-10, tuttavia non sempre riesce ad approssimare i valori relativi agli ultimi cicli. Una seconda legge applicabile è risultata essere l'equazione di Langmuir, che in generale ha presentato valori di  $R^2$  leggermente migliori. La legge è definita come:

$$(4.4) \quad y = a + b \frac{c x}{1 + c x}$$

per la quale si ritrova l'uso di 3 soli parametri, e il cui ruolo è di nuovo immediato:  $a$  come intercetta all'origine,  $b$  come parametro di dilatazione verticale;  $c$  decide la curvatura della funzione. Nel seguito di questa sezione faremo uso della legge di Langmuir per modellizzare gli andamenti misurati, con ciò indicando tra le righe che anche gli andamenti relativi ai dataset B e C sono risultati modellizzabili con la stessa legge. Segnaliamo tuttavia che la legge di potenza, interpolando meglio i dati relativi ai primi cicli, potrebbe rappresentare una valida alternativa qualora si decidesse di usare il sensore per misure che non durino più di una decina di cicli.

Fatte queste premesse procediamo a presentare i dati raccolti e le relative interpolazioni. Le Figure 4.16, 4.17 e 4.18 presentano i valori numerici che formano i dataset A, B e C con le relative interpolazioni. Si può osservare, tra i valori relativi al dispositivo DSC7, una variazione brusca dell'andamento intorno al ciclo 7. Questo comportamento non è stato spiegato, e rilancia la necessità di incrementare la numerosità campionaria qualora questo tipo di approccio matematico venisse definitivamente introdotto nel protocollo di utilizzo del sensore. Al tempo stesso si riporta che in presenza di alcalinizzazione del mezzo DMEM sono state osservate variazioni ancora più pronunciate della misura nell'intorno di quel ciclo; si sospetta che il pH possa avere un ruolo negli andamenti registrati.

La Tabella 4.1 riassume e mette a confronto i valori dei parametri nei diversi casi, insieme al valore del coefficiente di determinazione.

Dispositivo	Dataset	a	b	c	$R^2$
DSC7	A	0.06468	0.1275	0.05277	0.9926
DSC8	A	0.06411	0.1249	0.05903	0.9936
DSC7	B	0.5660	0.2986	0.02655	0.9955
DSC8	B	0.5667	0.2888	0.03722	0.9946
DSC7	C	-15.15	12.94	0.03065	0.9941
DSC8	C	-14.96	12.64	0.03821	0.9982

Tabella 4.1: Test su puro DMEM, 75 cicli, protocollo A. Interpolazione con legge di Langmuir: valore dei parametri.

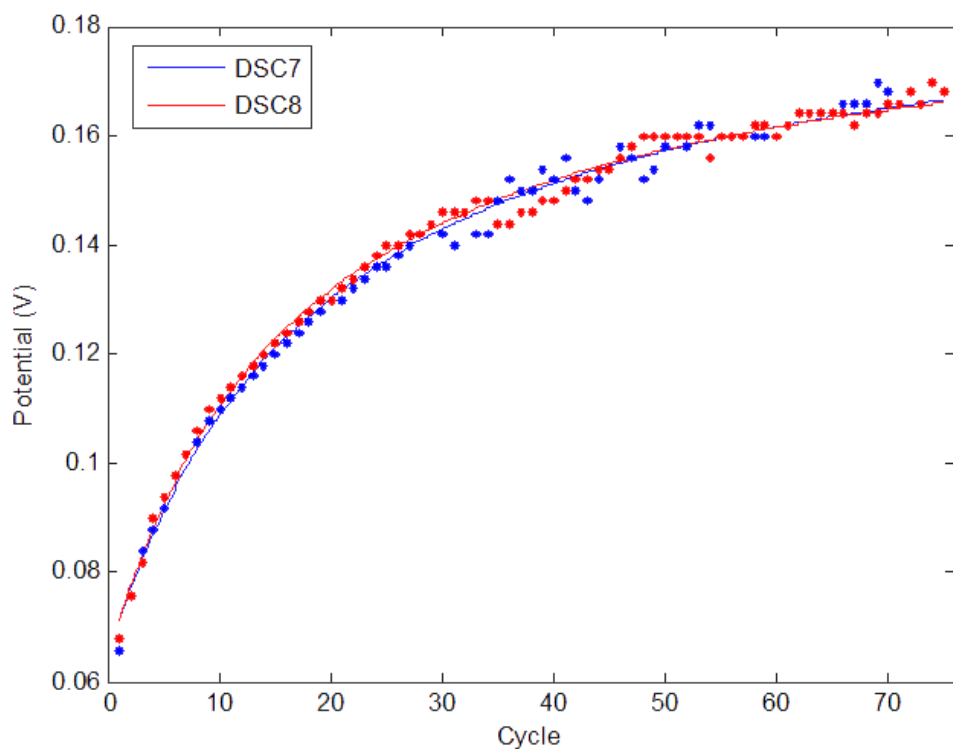


Figura 4.16: Ciclovoltammetria su DMEM, 75 cicli. Dataset A: dati misurati e fit secondo Langmuir.

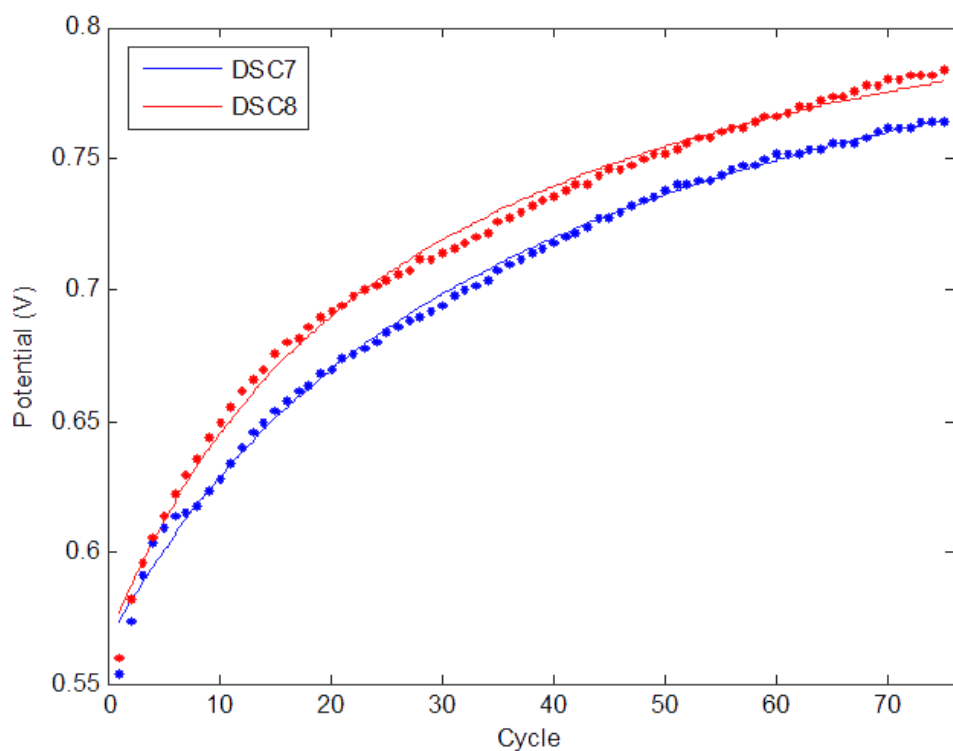


Figura 4.17: Ciclovoltammetria su DMEM, 75 cicli. Dataset B: dati misurati e fit secondo Langmuir.

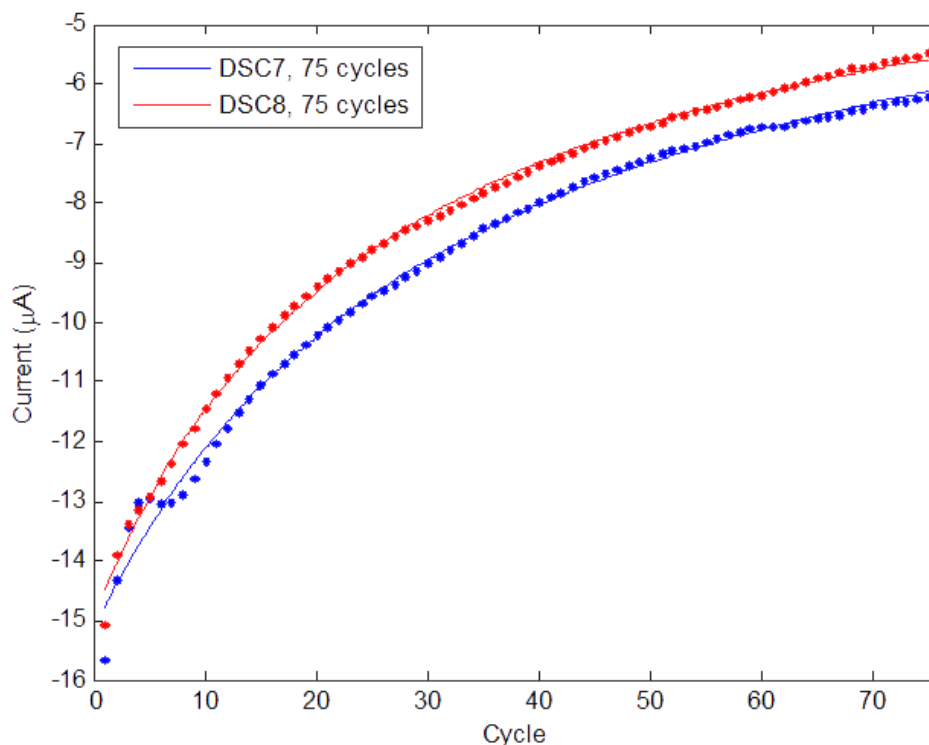


Figura 4.18: Ciclovoltammetria su DMEM, 75 cicli. Dataset C: dati misurati e fit secondo Langmuir.

#### 4.2.2 Analisi di misure su ferricianuro disciolto

In questa sezione vengono riportate misure su ferricianuro 5 mM diluito in 3 miscele di PBS e DMEM, rispettivamente in proporzione 90/10, 50/50 e 0/100 (DMEM puro). Le misure sono state eseguite secondo questa procedura: 50 cicli consecutivi di ciclovoltammetria realizzati con protocollo A su un'unica goccia di campione per ogni test. Ciascuna delle 3 miscele è stata testata su 2 DSC nuovi, per un totale di 6 dispositivi testati così denominati: DSC1 e DSC4 per la miscela 90/10, DSC3 e DSC6 per la miscela 50/50, DSC2 e DSC5 per la miscela 0/100. La scelta di usare ferricianuro 5 mM è dovuta al fatto che esso presenta picchi di ossidazione e riduzione ben definiti. Come set di dati usati per la modellizzazione del drift sono stati impiegati i valori di tensione in corrispondenza del picco di ossidazione. Il picco di riduzione è stato escluso in quanto non tutti i picchi, causa drift delle tracce, rientrano nella finestra di osservazione in potenziale; questo è vero anche per il picco di ossidazione, in particolare per alte percentuali di DMEM, ma in modo meno pronunciato.

Come già fatto in precedenza riportiamo (Figura 4.19) le tracce misurate di un solo dispositivo per ogni miscela, con lo scopo di evidenziare l'andamento complessivo delle misure; gli andamenti medi, per una selezione delle tracce, vengono riportati invece in Figura 4.20. È interessante osservare come già per piccole percentuali di DMEM (misura 90/10, 10% di DMEM) le tracce ciclovoltammetriche presentino un drift. Ad alte concentrazioni di DMEM inoltre si rileva una scomparsa del picco di ossidazione intorno al ciclo 27, sostituito da un andamento monotono delle tracce.

La Figura 4.21 mostra i valori di potenziale in corrispondenza dei picchi di riduzione insieme alle interpolazioni realizzate con legge di Langmuir. La Tabella 4.2 riassume e mette a confronto i valori dei parametri nei diversi casi, insieme al valore del coefficiente di determinazione. Per estrarre dalle curve i valori di picco è stato impiegato l'algoritmo



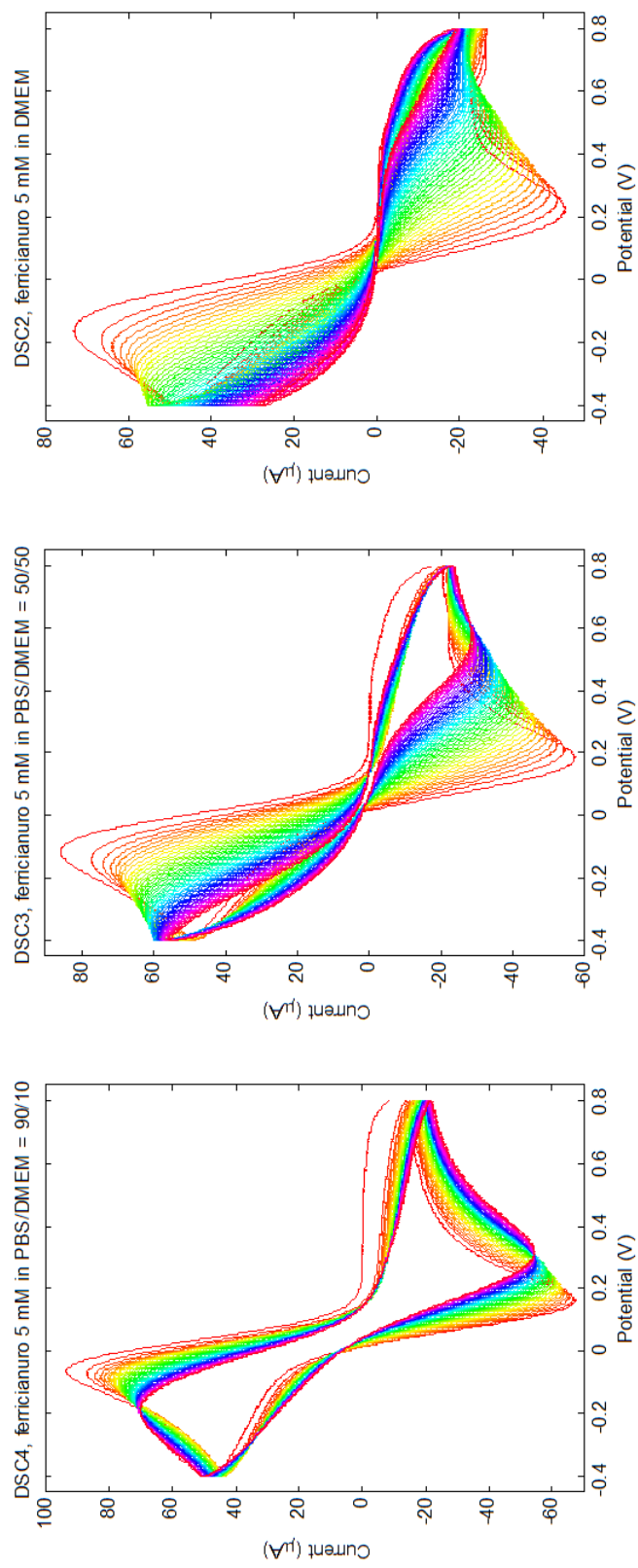


Figura 4.19: Ferricianuro 5 mM diluito in miscele di PBS e DMEM, tutti i cicli. Codifica colori a spettro.

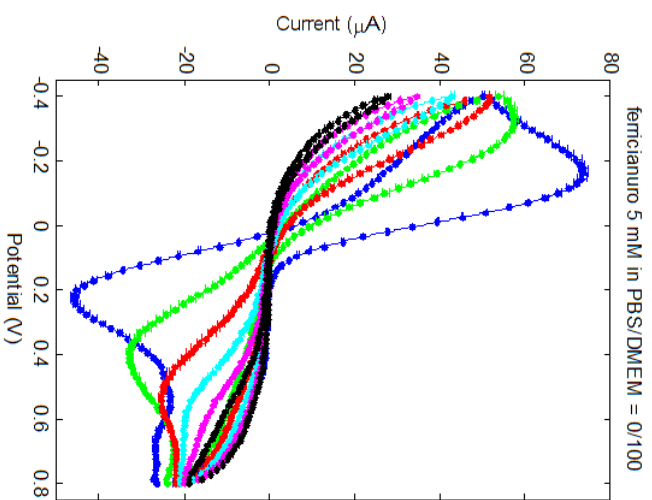
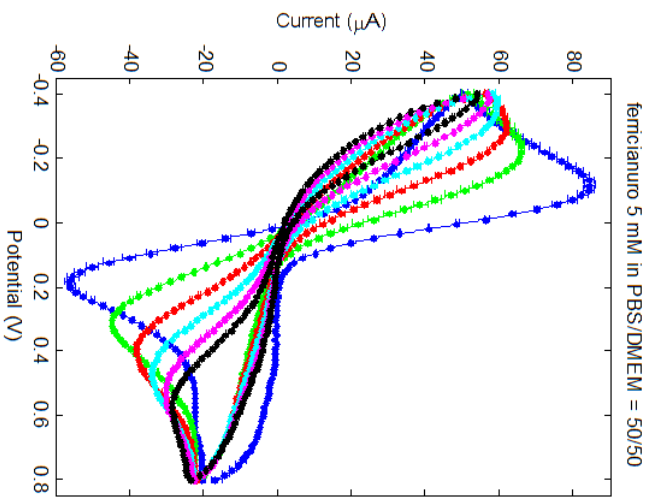
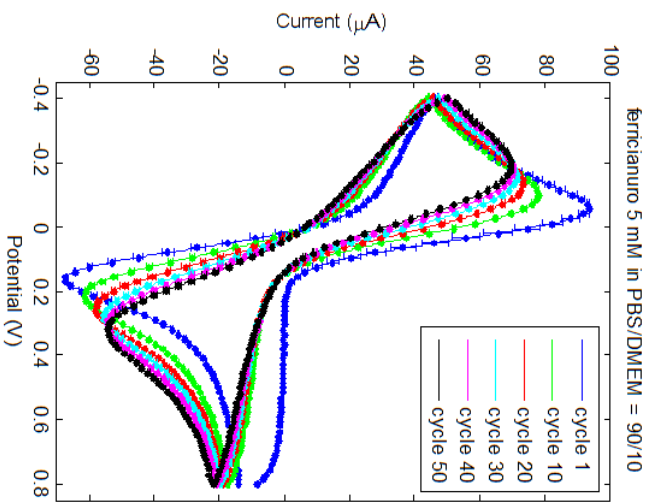


Figura 4.20: Ferricianuro 5 mM diluito in miscela di PBS e DMEM, valori medi con varianza su un sottinsieme dei cicli.

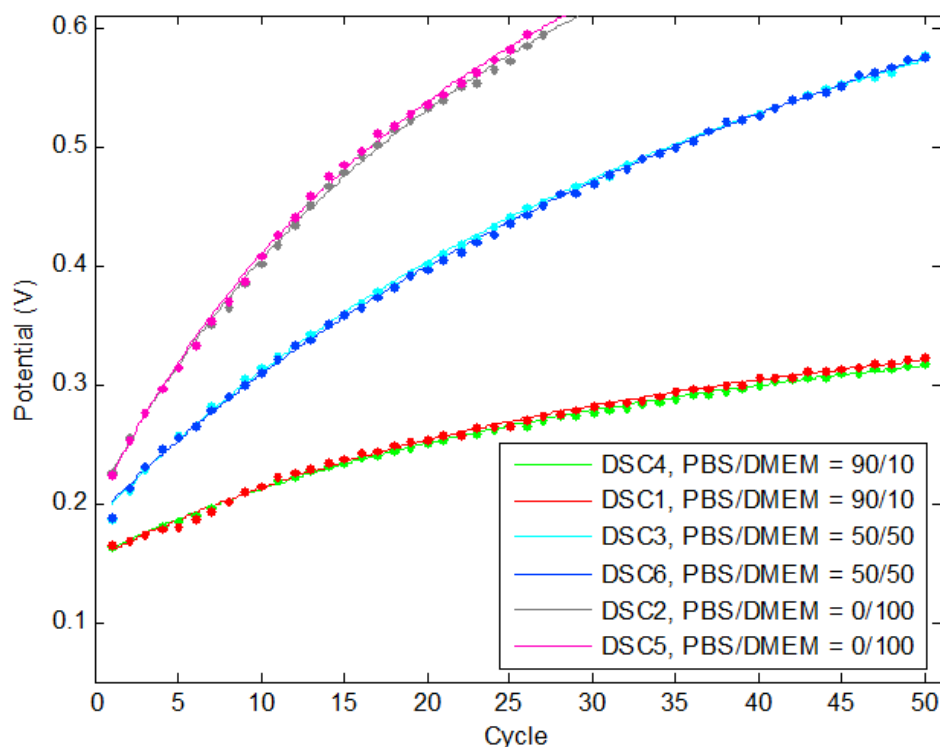


Figura 4.21: Ferricianuro 5 mM diluito in miscele di PBS e DMEM, interpolazione dei valori di potenziale in corrispondenza dei picchi di ossidazione.

riportato in Appendice C.2.

Osservando i valori tabulati si può osservare una sostanziale coerenza, perlomeno a livello

Dispositivo	PBS/DMEM	a	b	c	$R^2$
DSC1	90/10	0.1528	0.3029	0.02484	0.9973
DSC4	90/10	0.1555	0.2944	0.02385	0.9988
DSC3	50/50	0.1845	0.8037	0.01865	0.9993
DSC6	50/50	0.1883	0.8654	0.0161	0.9993
DSC2	0/100	0.2001	0.8599	0.03117	0.9989
DSC5	0/100	0.1966	0.8533	0.03318	0.9987

Tabella 4.2: Ferricianuro 5 mM diluito in miscele di PBS e DMEM. Interpolazione con legge di Langmuir: valore dei parametri.

di ordine di grandezza, per i parametri  $a$  e  $c$ ; il valore di  $c$  invece subisce una variazione più brusca. In conclusione rilanciamo il concetto all'origine di questo studio: il drift delle tracce ciclovoltammetriche indotto da DMEM può essere modellizzabile, ma i singoli valori numerici sono funzione delle condizioni al contorno e vanno valutate caso per caso.

### 4.3 Misure di spettroscopia d'impedenza

In questa sezione vengono riportate misure finalizzate a indagare la superficie degli elettrodi e le alterazioni indotte su di essi dai solventi di cui abbiamo fatto uso: PBS, DMEM, HBRS. Le misure sono state realizzate sia senza sia con mediatore redox: una miscela 1 mM di ferricianuro e ferrocianuro, disciolti in PBS. La prima considerazione da fare riguarda la tensione di bias da applicare alla cella elettrochimica. In presenza di mediatore

la tensione di bias deve garantire che tale specie redox sia attiva, pertanto viene scelto il valore di potenziale di riduzione del mediatore; questo si ricava come valore medio dei potenziali associati ai picchi di riduzione e ossidazione in una traccia ciclovoltammetrica. A questo scopo sono state eseguite misure di ciclovoltammetria su un campione di PBS con mediatore (Figura 4.22), ricavando per i due picchi rispettivamente i valori 0.021 V e 0.199 V; il valore medio è 0.11 V e come tale è stato impiegato per polarizzare la cella. In assenza di mediatore si pone bias nullo (0 V).

Fatta questa considerazione possiamo definire il setup impiegato per le misure di spettro-

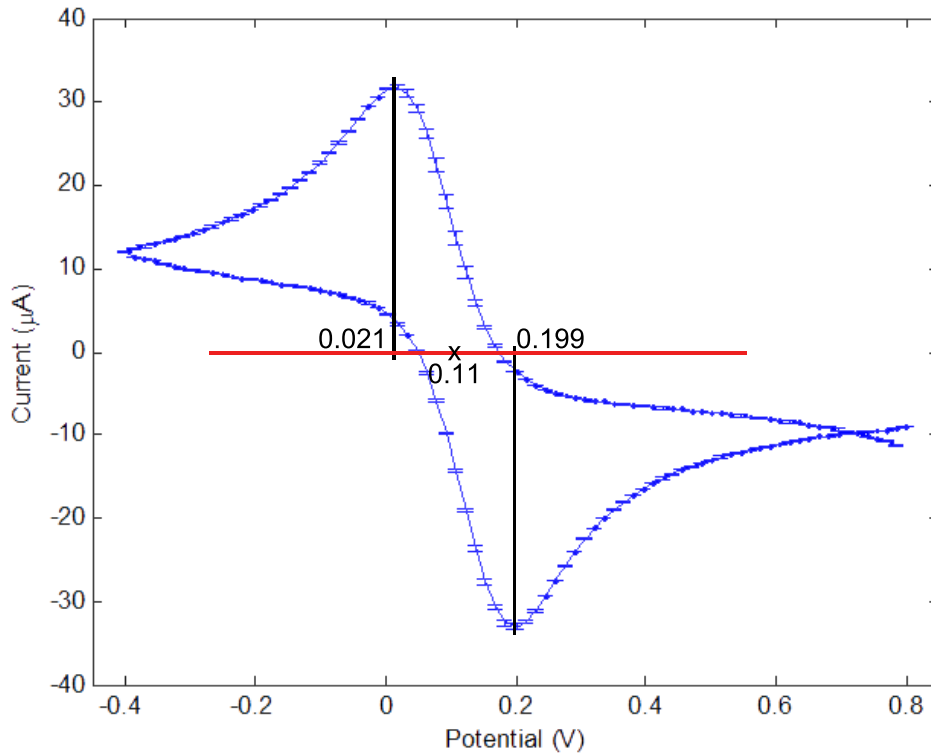


Figura 4.22: Determinazione del potenziale redox del mediatore impiegato nelle misure di spettroscopia d'impedenza. Valori medi su 2 dispositivi nuovi testati con un campione di mediatore in PBS, protocollo A, 1 ciclo. Si osservi che i picchi anodico e catodico hanno ampiezze comparabili, indice di sistema reversibile.

troscopia d'impedenza, che indicheremo per brevità come *protocollo base*:

- la cella è stata studiata su un intervallo in frequenza del segnale d'ingresso di 5 oppure 7 decadi, in entrambi i casi con una cadenza di osservazione di 5 punti per decade; in questa sezione parleremo di misure *standard* nel primo caso e di misure *estese* nel secondo;
- il bias imposto alla cella vale 0 V nel caso senza mediatore e 0.11 V nel caso con mediatore;
- per ogni misura standard sono state eseguite 50 ripetizioni consecutive sullo stesso dispositivo; per ogni misura estesa è stata eseguita una singola ripetizione. Questo aspetto sarà discusso nelle prossime righe.

Le misure qui riportate hanno fatto uso del protocollo base e sono state realizzate secondo la seguente procedura:

1. deposizione sul dispositivo del campione, consistente in una goccia di PBS (con o senza mediatore);
2. esecuzione di una misura estesa di spettroscopia d'impedenza, che chiameremo *estesa 1*;
3. esecuzione di 50 misure standard consecutive di spettroscopia d'impedenza;
4. esecuzione di una seconda misura estesa (*estesa 2*);
5. lavaggio del dispositivo e deposizione di una goccia di solvente puro;
6. esecuzione di 75 cicli di ciclovoltammetria con protocollo A;
7. lavaggio del dispositivo e ripetizione dei passi da 1. a 4.; in particolare nel ripetere il punto 1. si è usato un campione contenente mediatore solo se la stessa cosa era stata fatta prima della ciclovoltammetria. Le misure estese prendono i nomi di *estesa 3* (subito dopo la ciclovoltammetria) ed *estesa 4* (misura conclusiva dell'intero test).

L'intera procedura è stata applicata a tutte le 6 combinazioni solvente-campione, dove il solvente è uno tra PBS, DMEM e HBRS mentre il campione va considerato nelle varianti con e senza mediatore; per ognuna delle combinazioni sono stati testati 3 DSC nuovi, 18 dispositivi in totale. Si osservi che i dispositivi si differenziano per solvente solo dopo le ciclovoltammetrie: prima di queste l'unica differenza è data dalla presenza del mediatore, così che in tale fase si registrano 2 gruppi da 9 dispositivi tutti testati nello stesso modo. Approfondiamo la logica utilizzata. Ciascun test, per come è strutturato, si può dividere in due gruppi: un'indagine sull'effetto dei solventi sulla superficie degli elettrodi, formata dal gruppo di misure estesa 2 - ciclovoltammetria - estesa 3, e uno studio di ripetibilità costituito dai 2 gruppi di 50 ripetizioni standard; le misure estesa 1 ed estesa 4 pure rientrano nella seconda categoria. Nei prossimi paragrafi daremo rilievo alle misure del primo gruppo, maggiormente di interesse per lo studio presentato in questa Tesi; ci sembrava tuttavia necessario descrivere l'intera procedura con cui sono stati acquisiti i dati.

I valori d'impedenza (distinti in modulo e fase) registrati con le misure standard sono risultati comunque utili per la selezione dei dispositivi. Dei 18 DSC testati ne sono stati scartati 6, uno per ogni combinazione solvente-campione, che meno si adeguavano all'andamento generale delle curve misurate. Per la selezione dei dispositivi da scartare ci siamo affidati a mappe ciascuna delle quali osserva insieme le 50 ripetizioni da un valore fissato di frequenza, per valori tali da coprire in modo il più possibile uniforme le 5 decadi studiate. Mappe del genere sono state costruite per tutte le combinazioni solvente-campione, distinguendo tra le misure standard registrate prima (pre-) e dopo (post-) le ciclovoltammetrie (CV). Per le misure pre-CV, che non si differenziano per solvente, sono state sufficienti due mappe: una per tutti i 9 dispositivi testati con mediatore e una per i rimanenti 9 testati senza. In Figura 4.23 riportiamo a titolo di esempio la mappa relativa alle misure standard pre-CV senza mediatore, ritenendo che riportarle tutte e 8 non aggiungerebbe molto ai contenuti di questa Tesi. Le misure presentate nei successivi paragrafi 4.3.1 e 4.3.2 riguarderanno valori già relativi ai soli dispositivi non scartati.

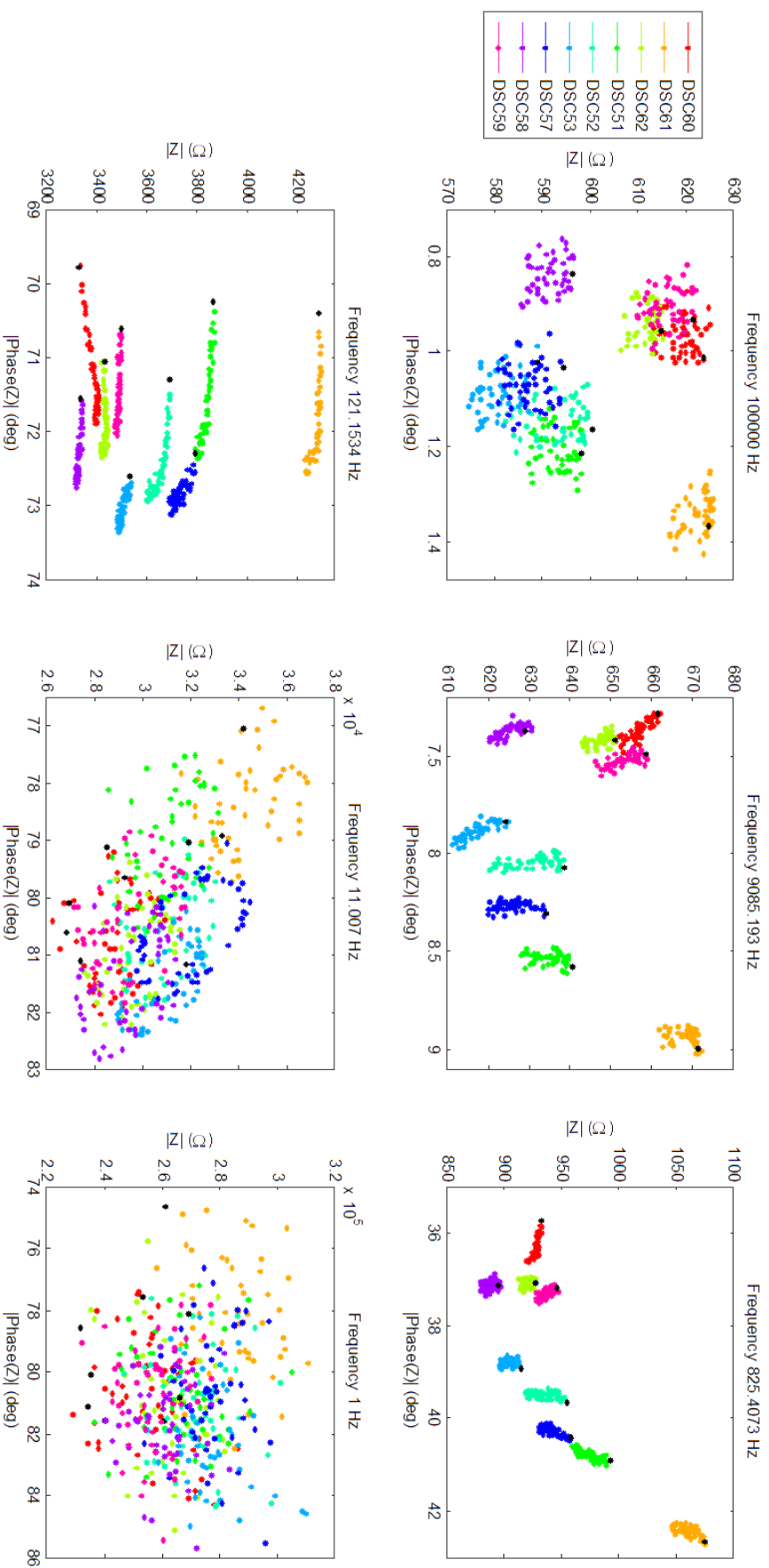


Figura 4.23: Misure standard precedenti la ciclovolammetria, campione senza mediatore. Mappa di selezione dei dispositivi. La prima ripetizione standard per ciascun dispositivo è indicata in nero per fornire ove possibile un'indicazione sulla direzione di spostamento delle tracce. Dal'osservazione di questa mappa è stato deciso di scartare il dispositivo DSC61 (arancione).

Un'ultima osservazione va fatta sulla validità dei dati misurati. Per valori d'impedenza troppo elevati in modulo (dell'ordine del  $M\Omega$ ) i valori registrati di corrente sono troppo piccoli ( $\sim 10$  nA) per non risentire pesantemente del rumore di misura. Ne consegue che questi dati, tipicamente registrati per bassissima frequenza del segnale d'ingresso, verranno ignorati nell'analisi e nei fit. Una considerazione analoga va fatta sui valori nell'intervallo 1 kHz - 10 kHz, spesso affetti da un rumore aleatorio la cui origine non abbiamo identificato.

### 4.3.1 Misure senza mediatore

Presentiamo in questo paragrafo le misure estesa 2 ed estesa 3 ottenute da campioni senza mediatore. La Figura 4.24 mostra il diagramma di Bode costruito dai valori registrati, distinguendo tra misure pre-CV (media su 6 dispositivi) e post-CV (media su 2 dispositivi per ciascun solvente).

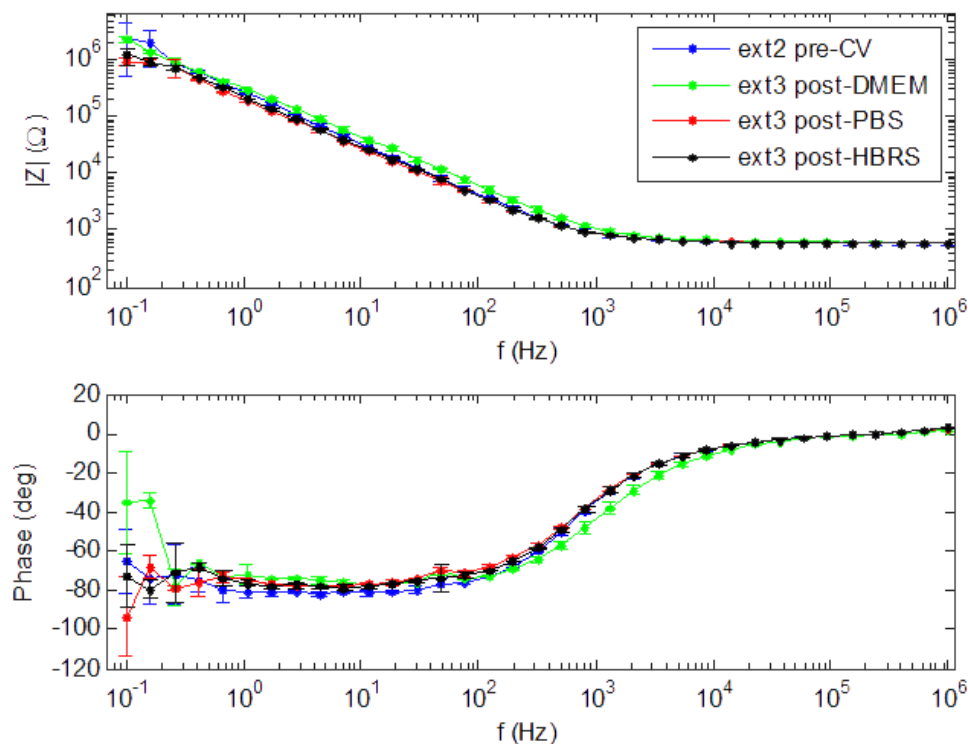


Figura 4.24: Misure estese 2 e 3 senza mediatore, diagramma di Bode.

Gli elementi da sottolineare sono due:

- il buon grado di coincidenza tra le curve nera, rossa e blu, a evidenziare il fatto che PBS e HBRS sono poco aggressivi nei confronti dell'elettrodo;
- il distacco segnato dalla curva verde, per la quale il modulo dell'impedenza nella zona del diagramma ad andamento capacitivo (100 mHz - 1 kHz) si distacca dalla curva pre-CV di qualche decina di  $k\Omega$ . Questo comportamento dà maggior forza all'idea che il DMEM alteri la superficie dell'elettrodo; la questione sarà approfondita nelle prossime pagine di questa sezione.

Vogliamo ora costruire un modello elettrico equivalente che descriva il comportamento misurato. L'andamento evidenziato in Figura 4.24 è quello tipico di una serie RC, ma la

fase si stabilizza intorno a  $-80^\circ$  anziché intorno a  $-90^\circ$ . La soluzione più immediata a questo problema consiste nel sostituire il condensatore con un elemento a fase costante (CPE, si veda la sezione 2.3.2.3). Il modello risultante è riportato in figura 4.25. Il significato fisico

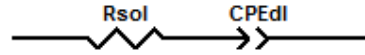


Figura 4.25: Modello circuitale equivalente della cella elettrochimica nelle misure spettroscopiche senza mediatore.

dei componenti è immediato:

- la resistenza è quella che la soluzione oppone al passaggio di carica;
- l'elemento a fase costante modella l'interfaccia soluzione-elettrodo;
- rispetto al modello di Randles (dettagliato in sezione 2.3.2.1) manca l'elemento di Warburg, una conseguenza della mancanza del mediatore in soluzione.

L'operazione di fit circuitale è stata eseguita attraverso il software ZView presentato in sezione 2.3.3.1. Per convergere, l'algoritmo di fit interno al software richiede di essere inizializzato facendo delle ipotesi (*guess*) sui valori di ciascuno dei parametri che descrivono il circuito. Ricordando l'espressione (2.41) dell'impedenza per un elemento a fase costante:

$$(2.41) \quad Z_{CPE} = \frac{1}{T(j\omega)^n}$$

si ricava che l'impedenza associata al circuito di Figura 4.25 vale banalmente:

$$(4.5) \quad Z = R_{sol} + \frac{1}{T(j\omega)^n}$$

la quale in alta frequenza tende a  $Z = R_{sol}$ . Per  $R_{sol}$  pertanto viene scelto come *guess* iniziale il valore di  $|Z(j\omega)|$  nella regione ad andamento resistivo in alta frequenza, pari a  $590 \Omega$  circa. Per l'elemento CPE si impongono invece valori tipici:  $10^{-6}$  per il parametro CPE-T, 0.9 per il parametro CPE-P. La Tabella 4.3 riporta i valori dei componenti come stimati dal software nei 4 casi in esame.

I valori tabulati non consentono di apprezzare sostanziali differenze tra i 4 casi se non il calo del parametro CPE-T nel passare da misura estesa 2 a estesa 3 nel caso del DMEM; limitatamente a questo esperimento la miglior evidenza della differenza di comportamento tra il DMEM e gli altri solventi ci viene dalla Figura 4.24. La situazione sarà ben diversa nel caso con mediatore. È comunque già un risultato interessante il fatto che il solvente HBRS si comporti come il PBS.

### 4.3.2 Misure con mediatore

Presentiamo in questo paragrafo le misure estesa 2 ed estesa 3 ottenute da campioni con mediatore. La Figura 4.26 mostra il diagramma di Bode costruito dai valori registrati, distinguendo tra misure pre-CV (media su 6 dispositivi) e post-CV (media su 2 dispositivi per ciascun solvente).

La presenza del mediatore amplifica la risposta del sistema elettrochimico al segnale



Misura	Parametro	Valore	Errore %
ext2 pre-CV	Rsol	600.8	0.59
	CPEdl-T	6.83E-7	1.21
	CPEdl-P	0.91	0.24
	$\chi^2$	0.00050	
ext3 post-DMEM	Rsol	622.3	0.53
	CPEdl-T	6.08E-7	1.79
	CPEdl-P	0.87	0.3
	$\chi^2$	0.00037	
ext3 post-PBS	Rsol	598	0.54
	CPEdl-T	9.94E-7	1.1
	CPEdl-P	0.87	0.23
	$\chi^2$	0.00042	
ext3 post-HBRS	Rsol	597.2	0.55
	CPEdl-T	8.95E-7	1.24
	CPEdl-P	0.88	0.25
	$\chi^2$	0.00043	

Tabella 4.3: Misure estese senza mediatore, valori di convergenza del fit circuitale.

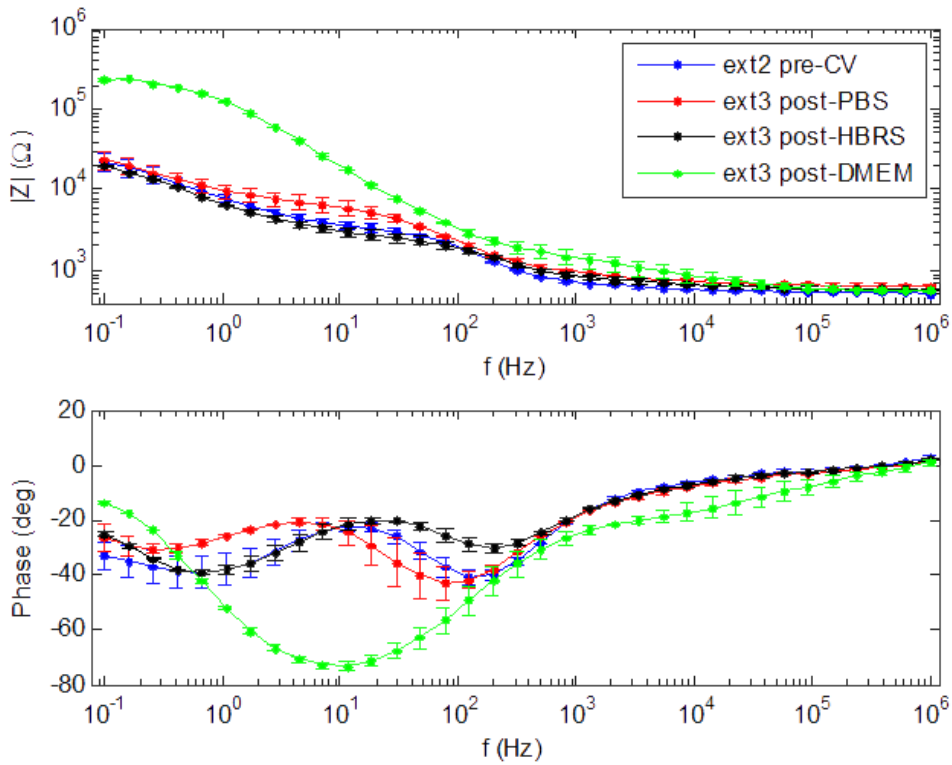


Figura 4.26: Misure estese 2 e 3 con mediatore, diagramma di Bode.

d'ingresso e consente di apprezzare dettagli che nelle misure del precedente paragrafo erano meno visibili. La traccia verde (post-DMEM) evidenzia che il sistema ha subito una chiara modifica rispetto allo stato precedente la ciclovoltammetria; la maggiore ampiezza delle barre d'errore nell'intorno dell'intervallo 1 kHz - 10 kHz è dovuto al rumore aleatorio già citato nell'introduzione alle misure di sezione 4.3. Il tampone HBRS continua a presentarsi come inerte nei confronti della superficie degli elettrodi, mantenendo una buona sovrapposizione con la traccia spettroscopica nera (pre-CV); il tampone PBS esibisce un

comportamento in prevalenza inerte eccetto che nella regione dello spettro tra 1 Hz e 100 Hz.

Il modello circuitale che proponiamo per modellizzare il comportamento spettroscopico della cella è riportato in Figura 4.27 e consiste in una cella di Randles con in serie un parallelo RC. L'impedenza associata a questa rete è:

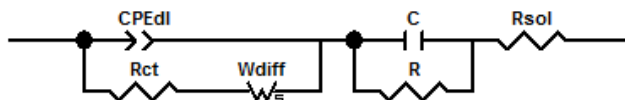


Figura 4.27: Modello circuitale equivalente della cella elettrochimica nelle misure spettroscopiche con mediatore.

$$(4.6) \quad Z(j\omega) = \frac{Z_{CPE}(R_{ct} + Z_s)}{Z_{CPE} + R_{ct} + Z_s} + \frac{R}{1 + j\omega RC} + R_{sol}$$

dove  $Z_{CPE}$  e  $Z_s$  sono definite rispettivamente dalle relazioni (2.41) e (2.36). Trattare direttamente questa espressione, riportata per completezza, è inutilmente macchinoso. Ci proponiamo piuttosto di individuare dei valori ragionevoli di guess iniziale direttamente dai diagrammi di Bode e Nyquist; il procedimento viene ora mostrato a titolo di esempio per la sola misura estesa 2 pre-ciclovoltammetria.

La determinazione del guess iniziale per  $R_{sol}$  ricalca il ragionamento fatto al precedente paragrafo consentendoci di scegliere il valore in alta frequenza di  $|Z(j\omega)|$ , ovvero 530  $\Omega$  circa. Per quanto riguarda le altre componenti resistive ci avvaliamo del diagramma di Nyquist riportato in Figura 4.28. In Figura è ben visibile la componente associata all'elemento di Warburg (si confronti con Figura 2.10). Il semicerchio relativo alla componente RC della cella di Randles si chiude intorno a  $Z' = Re(Z) = 3000\Omega$ , giustificando un valore di 1200  $\Omega$  come ipotesi iniziale per  $R$  e  $R_{ct}$ . Per i restanti parametri sono stati impiegati valori tipici:  $10^{-6}$  per  $C$  e CPE-T, 0.9 per CPE-P, W-P e W-T,  $10^4$  per W-R. Le Tabelle che seguono (da 4.4 a 4.6) riportano i valori dei componenti come stimati dal software per le misure pre-CV, post-PBS e post-HBRS.

Misura	Parametro	Valore	Errore %
ext2 pre-CV	CPEdl-T	5.5E-5	4.24
	CPEdl-P	0.5	1.62
	Rct	572.3	28
	Wdiff-R	64994	12.77
	Wdiff-T	0.76	8.86
	Wdiff-P	0.71	5.83
	C	1.18E-6	3.24
	R	1918	2.67
	Rsol	529.8	0.66
	$\chi^2$	0.00029	

Tabella 4.4: Misura estesa 2 con mediatore, valori di convergenza del fit circuitale.

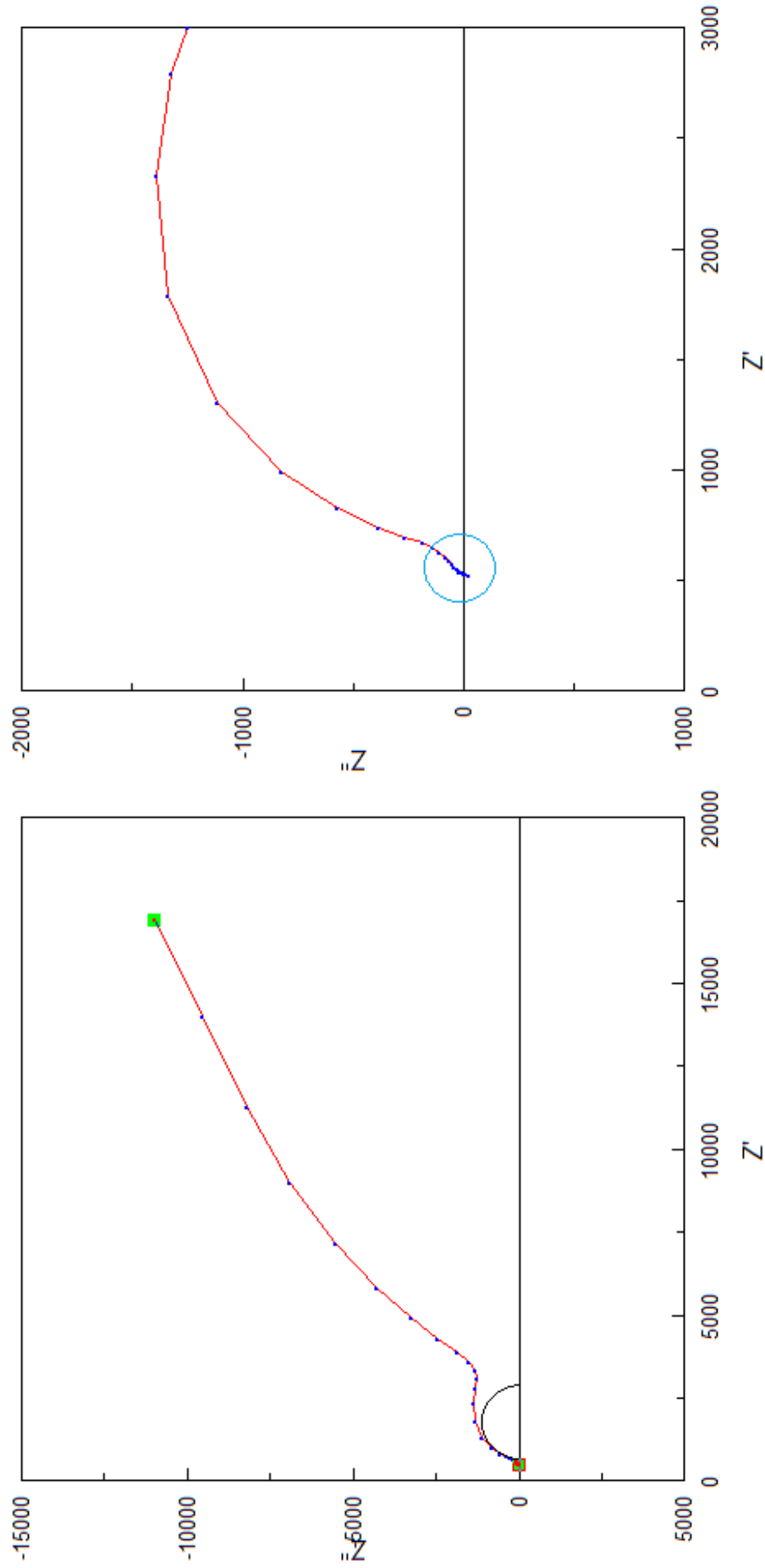


Figura 4.28: Misura estesa 2 con mediatore, pre-ciclovoltammtria. Diagramma di Nyquist (sinistra) con uno zoom della regione più prossima all'origine degli assi (destra). L'arco appena accennato visibile a destra (entro il cerchio azzurro) differenzia il diagramma da quello di una classica cella di Randles.

Misura	Parametro	Valore	Errore %
ext3 post-PBS	CPEdl-T	1.95E-5	31.5
	CPEdl-P	0.52	7.16
	Rct	639.9	23.38
	Wdiff-R	33017	6.86
	Wdiff-T	1.53	16.44
	Wdiff-P	0.47	1.77
	C	1.35E-6	1.48
	R	3612	1.62
	Rsol	624.9	0.65
	$\chi^2$	0.00011	

Tabella 4.5: Misura estesa 3 post-PBS con mediatore, valori di convergenza del fit circuitale.

Misura	Parametro	Valore	Errore %
ext3 post-HBRS	CPEdl-T	3.58E-5	9.71
	CPEdl-P	0.5	2.19
	Rct	708.1	27.12
	Wdiff-R	29619	8.04
	Wdiff-T	1.01	7.28
	Wdiff-P	0.6	3.46
	C	1.26E-6	6.36
	R	1075	3.94
	Rsol	586.8	0.72
	$\chi^2$	0.00022	

Tabella 4.6: Misura estesa 3 post-HBRS con mediatore, valori di convergenza del fit circuitale.

Per quanto concerne la misura post-DMEM, l'operazione di fit forniva valori dei parametri di  $W_{diff}$  tali da suggerirne la sostituzione con un cortocircuito; quest'operazione ha portato al modello circuitale equivalente di Figura 4.29, in cui la sostituzione di C con un secondo elemento a fase costante agevola la convergenza dell'algoritmo. In Tabella 4.7 sono riportati i valori dei componenti stimati dal software in corrispondenza di questo nuovo modello. Facciamo alcune osservazioni sui dati raccolti:

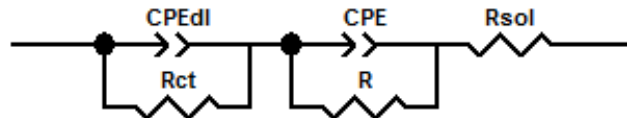


Figura 4.29: Modello circuitale equivalente della cella elettrochimica nella misura spettroscopica post-DMEM con mediatore.

- il modello di Figura 4.29 presenta 2 celle in serie costituite entrambe dagli stessi elementi circuitali. I valori assegnati a  $CPE$  ed  $R$  possono essere scambiati con quelli di  $CPE_{dl}$  e  $R_{ct}$ ;
- il valore di  $R$  cresce di 2 ordini di grandezza passando da PBS e HBRS a DMEM, indice di una maggiore difficoltà incontrata nello scambio elettronico. Questo è coerente con uno scenario di adsorbimento di molecole alla superficie degli elettrodi,

Misura	Parametro	Valore	Errore %
ext3 post-DMEM	CPEdl-T	1.54E-6	12.93
	CPEdl-P	0.61	2.17
	Rct	1669	2.69
	CPE-T	1.25E-6	1.34
	CPE-P	0.9	0.37
	R	229280	1
	Rsol	561.1	1.14
	$\chi^2$	0.00030	

Tabella 4.7: Misura estesa 3 post-DMEM con mediatore, valori di convergenza del fit circuitale.

- il fatto che Warburg non sia più un elemento rilevante del circuito ci comunica che il controllo cinetico del processo agli elettrodi è passato dal trasferimento di massa al trasferimento di carica. Anche questo è coerente con uno scenario di adsorbimento di molecole agli elettrodi.

Alla luce di questi elementi possiamo avanzare una proposta di interpretazione del modello, individuando nel parallelo RC (o R-CPE) in serie alla cella di Randles una modellizzazione dell'adsorbimento, quasi una seconda interfaccia localizzata (nulla impone che le molecole adsorbite mascherino completamente l'elettrodo) e interposta tra elettrodo e soluzione.

Vogliamo concludere questo capitolo con un'immagine comparativa che dà maggiore forza ai concetti esposti. La Figura 4.30 mostra un DSC sul quale è deposta una goccia di NADH disciolto in DMEM, all'inizio e poi alla fine di un test che ha visto alternarsi sul dispositivo 10 gocce in tutto. La prima goccia ha una forma ben circolare, compresa all'interno della regione idrofila del sensore delimitata dagli elettrodi; la decima goccia traborda nella circostante regione originariamente idrofoba, a conferma di un'avvenuta modifica superficiale indotta dal liquido di coltura.



Figura 4.30: Modifiche superficiali indotte da DMEM: un indizio empirico.



## Capitolo 5

# Misure di rilevazione diretta di molecola target

In questo Capitolo viene trattata la rilevazione di NADH disciolto in DMEM e HBRS. Al solito verranno presentate anche le misure svolte facendo uso di tampone PBS. Per queste misure è stata applicata una variante del protocollo A introdotto in sezione 4.1: a  $V_{init} = 0.8\text{ V}$  è stato sostituito  $V_{init} = -0.4\text{ V}$ . La giustificazione risiede nel fatto che queste misure sono specifiche per la rilevazione di NADH, che della coppia redox NADH/NAD<sup>+</sup> è la versione ridotta; la scelta più sensata pertanto è collocarsi fin da subito sulla curva di ossidazione. Questo standard di misura è qui chiamato *protocollo B* e viene di seguito riassunto:

- $V_{init} = -0.4\text{ V}$ ;
- $V_{high} = 0.8\text{ V}$ ;
- $V_{low} = -0.4\text{ V}$ ;
- scan rate = 100 mV/s;
- tempo di attesa = 2 s;
- intervallo di campionamento in ascissa = 1 mV;
- dispositivo DSC (DropSens Carbon DRP110);
- volume della goccia deposta = 100  $\mu\text{l}$ .

Approfondiamo ora una questione importante per le misure che seguono: il *blank*. Con questo termine, preso in prestito dalla letteratura scientifica inglese, si intendono le misure svolte in assenza dell'analita e il cui scopo consiste nel fare da riferimento, da misura "a vuoto".

I test che verranno presentati in questo Capitolo consistono in curve di calibrazione costruite testando 10 concentrazioni di NADH (1, 2, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000  $\mu\text{M}$ ) rispettivamente disciolto in PBS, DMEM e HBRS. Ciascuna concentrazione è stata testata attraverso ciclovoltammetria su 3 dispositivi DSC. Se il test fosse stato eseguito impiegando misure *one-shot*, ovvero usando solo dispositivi nuovi per ciascuna misura, sarebbero stati consumati ben 90 DSC (e questo senza considerare le misure di blanking). L'alternativa ovvia consiste nell'impiegare lo stesso dispositivo per testare tutte e 10 le concentrazioni; in questo modo il consumo di DSC cala drasticamente da 90 a 9, più pochi altri per le misure di riferimento.

Questo approccio ha un difetto palese: dalla seconda concentrazione testata in poi il dispositivo è usato. La superficie dei suoi elettrodi può essere stata interessata da fenomeni di adsorbimento (come minimo di molecole di acqua). Le operazioni manuali di lavaggio e asciugatura del dispositivo tra una concentrazione e la successiva introducono un'ulteriore fonte di variabilità, dal momento che non possono essere ripetute esattamente uguali ogni volta. Per ovviare a questi problemi sono stati messi in pratica due accorgimenti:

- le concentrazioni sono state testate dalla più piccola ( $1 \mu M$ ) alla più grande ( $1 mM$ ) per minimizzare la contaminazione nei confronti della misura successiva;
- sono state eseguite delle misure di riferimento.

Per raccogliere i dati di riferimento le misure sono state ripetute uguali, semplicemente senza NADH e su 2 DSC soltanto per ognuno dei 3 solventi (6 DSC in totale). Detto altrimenti, per ciascun dispositivo sono stati eseguiti 10 test di ciclovoltammetria su solvente puro; tra un test e il successivo il dispositivo è stato lavato e asciugato e una nuova goccia di solvente deposta. Le misure di blank hanno un duplice impiego:

- consentono di validare o invalidare singoli valori della retta di calibrazione. Se c'è sovrapposizione tra le barre d'errore di un punto della retta col corrispondente punto del riferimento risulta impossibile distinguere il caso con NADH da quello senza analita, e pertanto la concentrazione di NADH corrispondente va dichiarata non rilevabile (con questo protocollo);
- possono essere sottratte dalle curve misurate con NADH, così da isolare il contributo dovuto al solo analita.

Bisogna fare un'osservazione importante sul protocollo di blanking. La misura di riferimento più corretta per il test della concentrazione n-esima sarebbe quella in cui si misura NADH disciolto in solvente per le precedenti (n-1) misure e solvente puro solamente durante l'n-esima; in questo modo solo l'n-esima misura del dataset di riferimento differisce da quella con NADH, e la sottrazione del blank elimina effettivamente tutta la storia pregressa del dispositivo. Questa opzione tuttavia richiede nuovamente di consumare decine di dispositivi e pertanto è stata scartata: volendo fare uno studio molto accurato è sempre preferibile misurare ogni concentrazione su un dispositivo nuovo (approccio one-shot) piuttosto che affidarsi a operazioni di post-elaborazione dei dati come la sottrazione del blank.

Vogliamo spendere ora qualche parola sulla selezione dei valori di picco. La prima cosa da considerare è il problema degli interferenti. Come detto in sezione 4.1, nell'introduzione alle misure, il NADH si ossida per valori compresi tra 0.47 V e 0.59 V in cella DSC. Questi valori non sono troppo distanti da quelli per i quali si ha elettrolisi in cella dell'acqua (nonché delle vitamine del DMEM); i segnali di corrente associati a questi processi mascherano, alle basse concentrazioni, il picco di corrente correlato alla presenza di NADH. La Figura 5.1 rende visivamente il concetto.

Lo scopo delle misure presentate in questo Capitolo è quello di costruire una curva di calibrazione del sensore, ovvero stabilire una relazione tra la concentrazione di NADH diluito e i valori di corrente misurati nel picco di ossidazione (il picco di riduzione non compare nella finestra di tensione del protocollo B). È immediato capire che la presenza di interferenti in questo contesto costituisce un problema perché rende irrilevabili i picchi, perlomeno per basse concentrazioni di NADH ( $1 \mu M \div 5 \mu M$ ) dove il picco associato all'analita è di ampiezza modesta. Noi tuttavia siamo interessati soltanto a verificare che una data concentrazione di NADH sia o non sia rilevabile; in questo scenario la presenza di un picco definito può essere secondaria. Detto altrimenti non siamo interessati tanto a



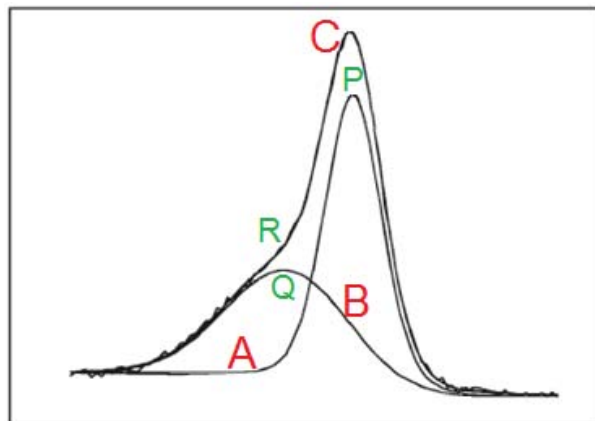


Figura 5.1: Picchi di corrente, segnale somma; illustrazione concettuale. Il segnale A rappresenta il contributo di corrente degli interferenti elettrochimici. Il segnale B rappresenta il contributo di corrente dell'analita, quindi il segnale utile che vorremmo isolare all'interno del ciclo voltammogramma. Il rapporto tra le ampiezze dei picchi P e Q dei due segnali va a sfavore del secondo, così che nel segnale somma C il picco Q scompare, lasciando solo un rigonfiamento R nella traccia (segmento monotono di curva) a segnalare la sua presenza.

vedere un picco quanto a rilevare differenze misurabili tra il test su solvente puro (blank) e la misura di NADH disciolto nel solvente. Si sottolinea così nuovamente l'importanza di avere a disposizione le misure di blank.

Il problema a questo punto diventa la scelta dell'ascissa in corrispondenza della quale sottrarre il blank, proprio in virtù del fatto che il picco è assente. Con riferimento alla Figura 5.1 ci stiamo cioè chiedendo come individuare l'ascissa di Q avendo a disposizione solo la curva C. Vi sono più possibilità:

- in presenza di un elettrodo di riferimento ci si aspetta che il picco di ossidazione si mostri sempre per lo stesso valore di tensione. In questo scenario è sufficiente tagliare la traccia ciclo voltammometrica per quel valore di tensione. Il valore in questione può essere ricavato da letteratura oppure valutato sulle curve di NADH disciolto in alta concentrazione, dove di solito il picco è ben visibile;
- in presenza di un elettrodo di pseudo-riferimento, oppure di adsorbimento di molecole alla superficie degli elettrodi, il valore in tensione del picco può spostarsi. Nel momento in cui, alle basse concentrazioni, il picco cessa di essere rilevabile sono possibili due strade:
  - prendere a riferimento il valore in tensione dell'ultimo picco rilevato, dove per ultimo si intende quello ancora visibile alla concentrazione più bassa possibile, e usare quel valore per sezionare le tracce ciclo voltammometriche delle concentrazioni inferiori. Questo approccio è concettualmente imperfetto ma comodo;
  - modellizzare il drift della posizione in tensione del picco avvalendosi delle curve che esibiscono picco, quindi quelle alle medie e alte concentrazioni (diciamo sopra a  $10 \mu M$ ) e dal fit dell'andamento ricavare i valori di tensione da usare alle basse concentrazioni. Questo approccio è più macchinoso ma concettualmente più solido, e si avvale anche dei risultati mostrati in sezione 4.2 per affermare che una modellizzazione è possibile.

Nonostante le affermazioni fatte si è deciso di applicare il primo approccio. La giustificazione risiede in più elementi:

- si tratta di un approccio più rapido, in una fase del progetto ancora esplorativa delle potenzialità del sensore più che di ottimizzazione delle sue prestazioni. Si tratta in ultima analisi di misure preliminari, che altri dopo di noi approfondiranno in previsione dell'immissione sul mercato del dispositivo finale;
- lo scopo dichiarato, come detto sopra, è quello di verificare se è possibile rilevare differenze misurabili tra i casi con e senza NADH; la sottrazione del blank è comunque in grado di isolare il contributo del NADH, sia che sia fatto sui valori di picco, sia che sia fatto per valori prossimi al picco.

La scelta fatta implica, riassumendo, che alle basse concentrazioni sono stati valutati gli andamenti di corrente per valori di potenziale in un intorno del valore ottimo. Questo può giustificare la non linearità esibita alle basse concentrazioni dalle curve di calibrazione (si vedano le Figure di sezione 5.2).

- nel caso del DMEM nessuna curva esibisce picchi, neppure alle altissime concentrazioni (1 mM). La curva di calibrazione è stata costruita sui valori di minimo assoluto intorno a  $V_{high}$ .

## 5.1 Misure di riferimento

In questa sezione presentiamo le misure di riferimento (blank) ovvero le misure realizzate su solvente puro (PBS, DMEM, HBRS) senza NADH. I blank sono stati ricavati secondo questa procedura: 50 cicli di ciclovoltammetria realizzati con protocollo B e suddivisi in 10 ripetizioni da 5 cicli, ciascuna separata dalle altre da un'operazione di lavaggio e asciugatura del DSC e deposizione di una nuova goccia di solvente. L'intera misura è stata ripetuta identica su un secondo dispositivo DSC.

La Figura 5.2 presenta il primo ciclo per ciascuna delle 10 ripetizioni sui tre solventi, valori medi con deviazione. Tralasciando il DMEM, già ampiamente discusso nel Capitolo precedente, possiamo fare un'osservazione: le curve relative a PBS e HBRS esibiscono un drift iniziale. Nel caso del PBS bisogna tenere in considerazione i valori di corrente: il drift maggiore è di appena 200 nA, inoltre inizia a stabilizzarsi già dalla seconda ripetizione (si guardino i valori a 0.8 V che esibiscono il drift iniziale maggiore). Questo comportamento è compatibile col primo utilizzo del dispositivo, nuovo fino alla ripetizione 1; il semplice adsorbimento di acqua alla superficie può essere sufficiente a motivare la differenza tra le ripetizioni 1 e 2. Nel complesso il PBS si conferma una sostanza poco aggressiva nei confronti degli elettrodi.

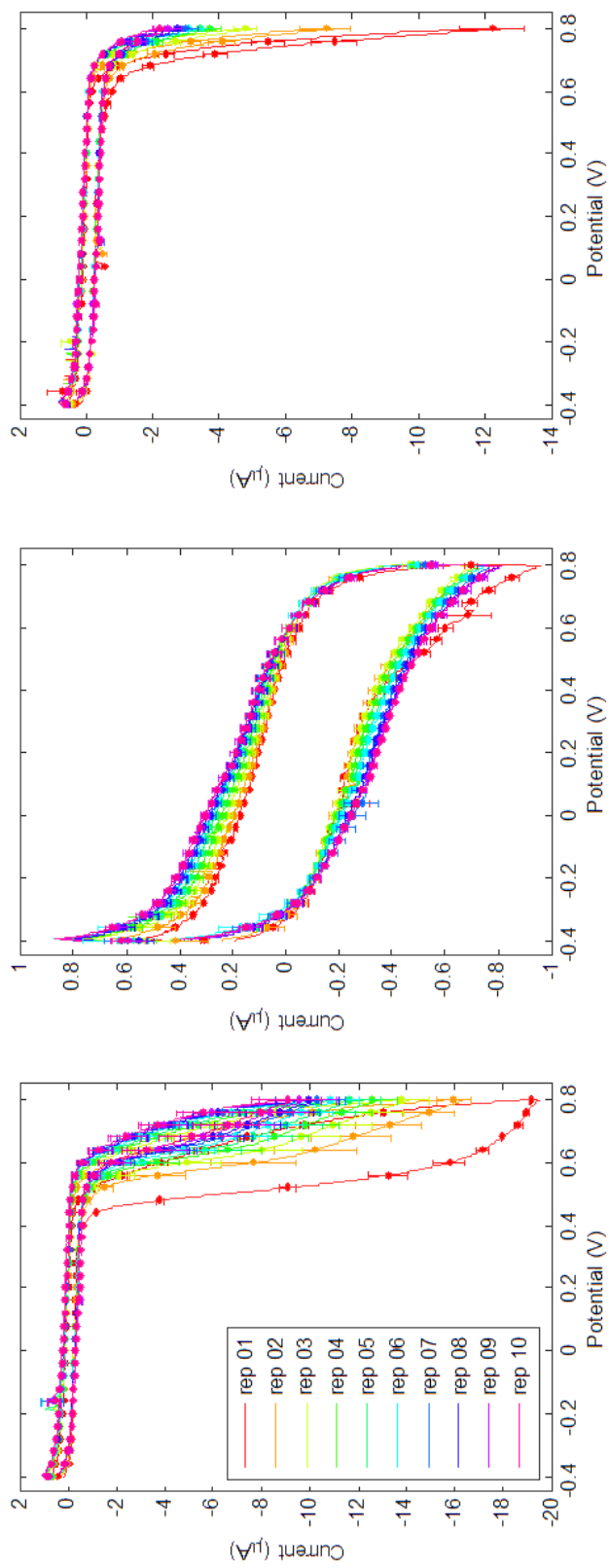


Figura 5.2: Misure di riferimento per la curva di calibrazione del sensore, soli cicli 1 per ognuna delle 10 ripetizioni. Da sinistra verso destra le curve sono riferite a DMEM, PBS e HBRS. La legenda a colori riportata a sinistra è valida per tutti i grafici presentati.

Nel caso dell'HBRS il drift è decisamente maggiore, circa  $4.5 \mu A$  tra ripetizione 1 e 2. Considerando che l'HBRS è formato solo da 4 sali e HEPES (Tabella 3.3) è verosimile individuare nella molecola organica la specie redox responsabile del segnale di corrente rilevato. È possibile spiegare il drift con l'adsorbimento di acqua ed HEPES alla superficie degli elettrodi, tuttavia esso si assesta entro poche ripetizioni (contrariamente a quanto rilevato con DMEM); inoltre le misure di sezione 4.3 hanno suggerito un comportamento poco aggressivo dell'HBRS nei confronti degli elettrodi. Considerando anche che il segnale di corrente mostra un ginocchio intorno a 0.6 V, ed è sostanzialmente piatto prima di tale valore, possiamo affermare che l'HEPES non si configura come un interferente pericoloso nei confronti del NADH se non per bassissime concentrazioni dell'analita.

## 5.2 Misure di molecola target in soluzione

In questa sezione proponiamo le misure di rilevazione di NADH disciolto in due buffer (PBS, HBRS) e in un liquido di coltura cellulare (DMEM) nonché le curve di calibrazione costruite a partire da questi dati. Le misure sono state realizzate secondo questa procedura: 50 cicli di ciclo voltammetria realizzati con protocollo B e suddivisi in 10 ripetizioni da 5 cicli, ciascuna separata dalle altre da un'operazione di lavaggio e asciugatura del DSC e deposizione di una nuova goccia di campione. I campioni sono stati testati per concentrazioni di NADH crescenti, nell'ordine: 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000  $\mu M$ . L'intero test è stato eseguito su 3 DSC per ogni solvente, quindi nel complesso sono stati impiegati 9 dispositivi.

Come fatto in precedenza ci proponiamo di fornire innanzitutto una panoramica generale dell'andamento delle misure, tutti i 5 cicli per ogni concentrazione e per ogni solvente. A questo scopo presentiamo al solito le misure rilevate su uno solo dei dispositivi per ogni solvente (Figure 5.4, 5.3 e 5.5), demandando ai grafici successivi lo studio in media e varianza dei risultati.

Alcune osservazioni sui dati misurati:

- il segnale di corrente mostra due componenti: analita e interferenti. Il segnale utile associato all'analita cresce in modulo, come è ovvio, al crescere della concentrazione; il segnale di disturbo associato agli interferenti presenta un drift che lo porta progressivamente a calare in modulo, tematica già trattata nel Capitolo 4, e ciò a causa dell'adsorbimento di molecole alla superficie (specie nel DMEM) e all'assenza di un picco di riduzione. Questo opposto comportamento dei due contributi di corrente genera gli andamenti a campana visibili nelle Figure. Inizialmente (alle basse concentrazioni di NADH) le tracce di ossidazione calano in modulo: il contributo utile è trascurabile rispetto a quello di disturbo, e quest'ultimo presenta una deriva verso l'ordinata nulla. Successivamente si raggiunge un punto di stasi (medie concentrazioni) superato il quale le curve riprendono a spostarsi verso valori di corrente più negativi (alte concentrazioni): questa volta è il contributo di disturbo a essere trascurabile rispetto al segnale utile, e quest'ultimo si allontana dall'ordinata zero al crescere della concentrazione di NADH.

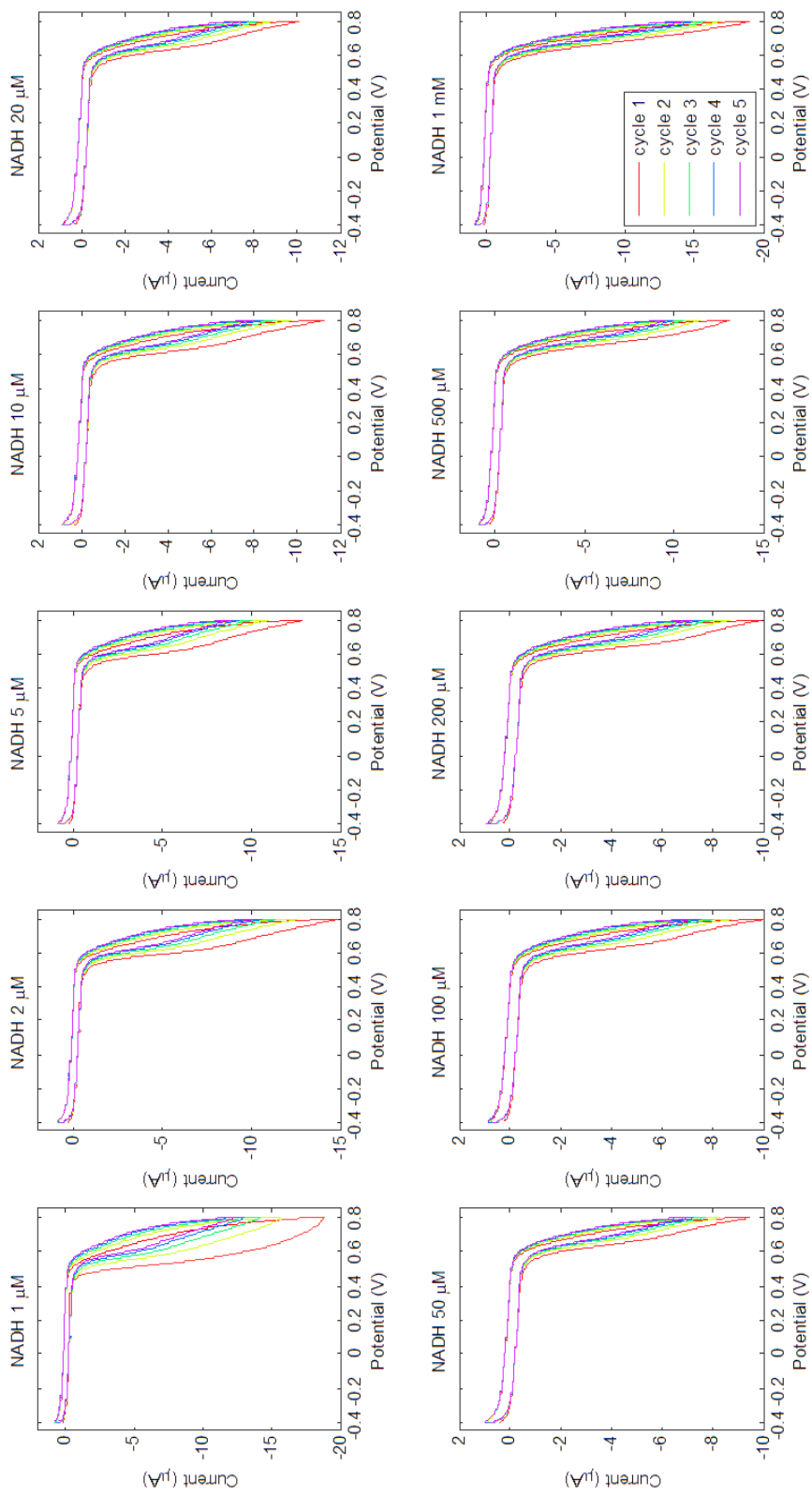


Figura 5.3: Misure di rilevazione di NADH in DMEM per 1 dei 3 dispositivi testati. Andamento generale delle tracce ciclovoltammetriche. La legenda a colori riportata in basso a destra è valida per tutti i grafici presentati.

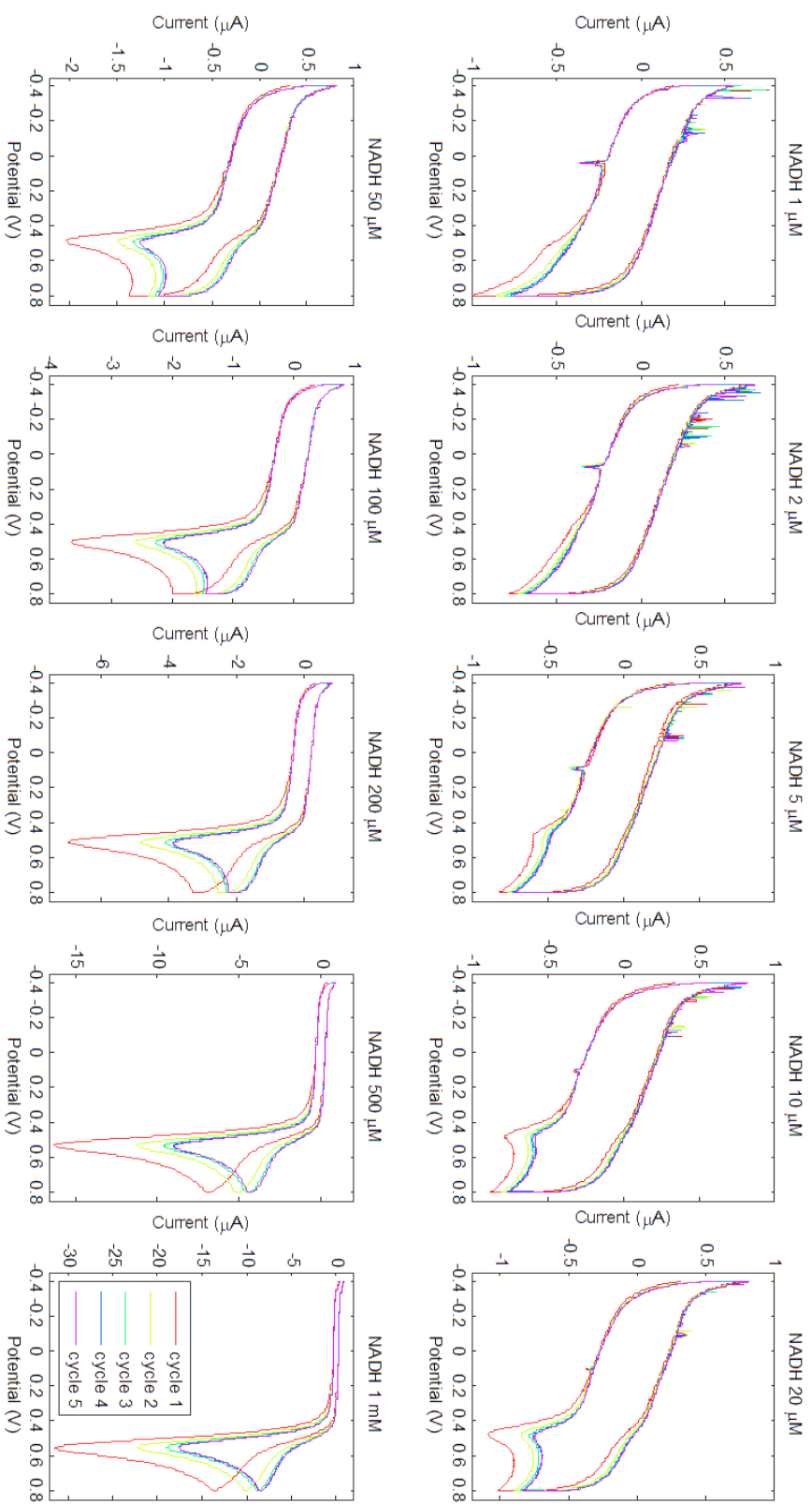


Figura 5.4: Misure di rilevazione di NADH in PBS per 1 dei 3 dispositivi testati. Andamento generale delle tracce ciclovoltammetriche. La legenda a colori riportata in basso a destra è valida per tutti i grafici presentati.

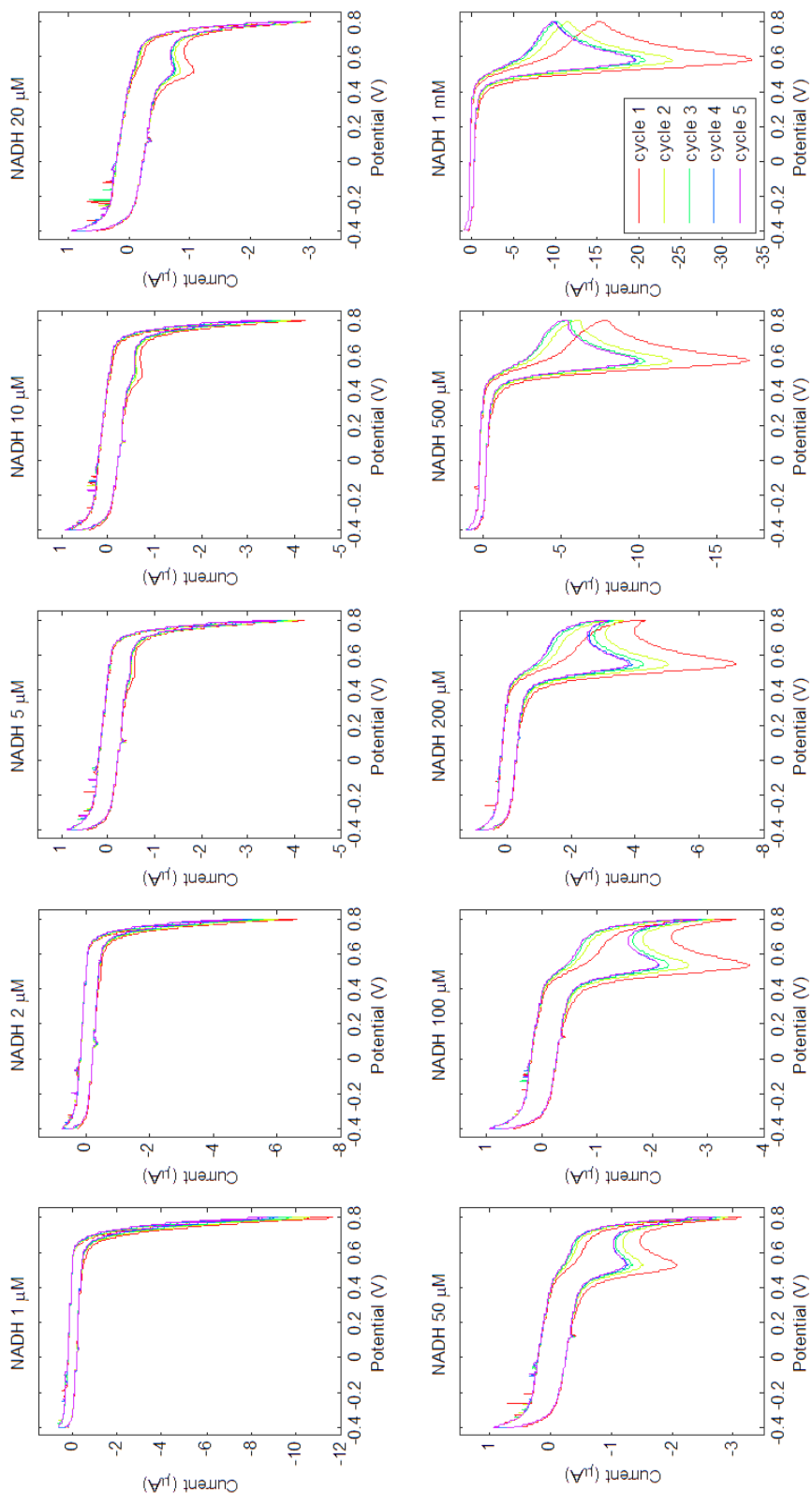


Figura 5.5: Misure di rilevazione di NADH in HBRs per 1 dei 3 dispositivi testati. Andamento generale delle tracce ciclovoltammetriche. La legenda a colori riportata in basso a destra è valida per tutti i grafici presentati.

- mancando un picco di riduzione che rigeneri NADH dal NAD, il segnale utile di corrente di ossidazione non può che calare ciclo dopo ciclo, al punto che è possibile per alcune concentrazioni che i primi cicli mostrino un picco e gli ultimi solo un rigonfiamento di una traccia monotona. Il picco del primo ciclo in conclusione è quello meglio definito: per questo motivo ci concentreremo da adesso in poi sui soli cicli 1 di ciascun test;
- l'ampiezza dei picchi spuri di riduzione esibiti dal PBS è dell'ordine delle centinaia di nA.

Dai dati misurati possiamo ora estrarre i valori di picco secondo i criteri esposti nell'introduzione del Capitolo 5. Indichiamo che per l'estrazione dei picchi visibili si è fatto uso dell'algoritmo presentato in Appendice C.2. La prima operazione di analisi consiste nel confrontare i valori di picco con quelli di blank: qualora vi sia sovrapposizione tra le barre d'errore dobbiamo dichiarare non rilevabile la concentrazione di NADH relativa. Questa operazione viene riportata nelle prossime Figure 5.6-5.8 divisa per solvente.

Le Figure ci informano che nel caso di PBS e HBRS la minima concentrazione rilevabile

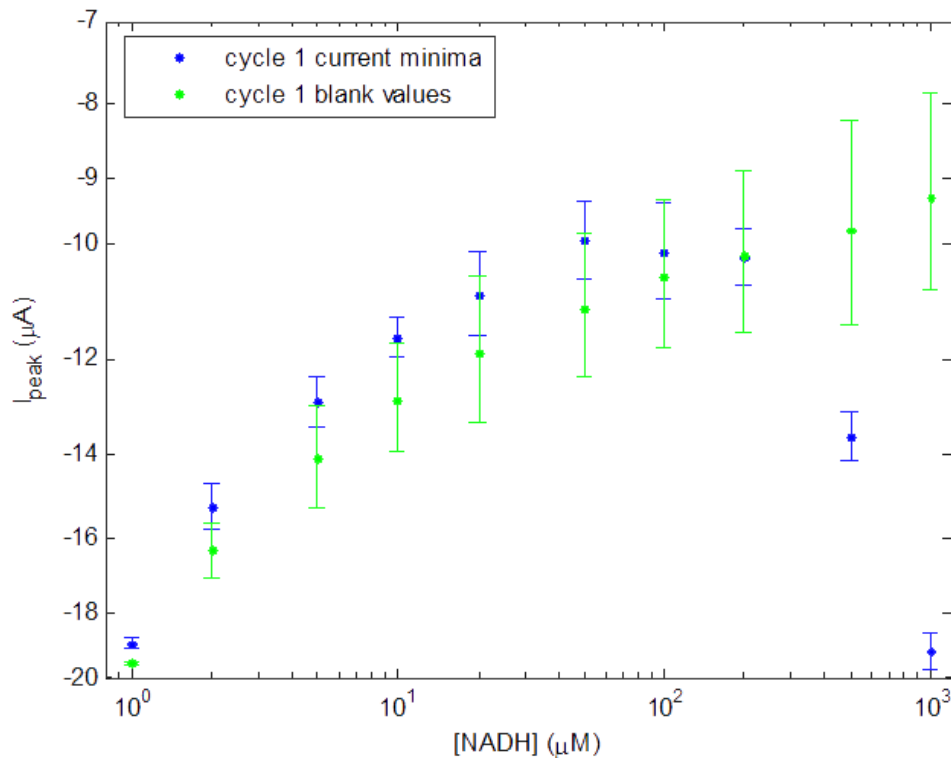


Figura 5.6: NADH in DMEM, valori di picco confrontati coi valori di riferimento.

è pari a  $2 \mu M$ , laddove nel DMEM di fatto non c'è rilevabilità se non alle altissime concentrazioni; in quest'ultimo caso in particolare è palese l'andamento a campana dei valori prima descritto. Questa misura conclude formalmente le nostre indagini sul DMEM affermando la sua impraticabilità come mezzo solvente per la rilevazione di NADH e rilancia l'idea di un suo utilizzo come solo mezzo di coltura, da sostituire prima delle misure con HBRS. Nel caso di PBS e HBRS possiamo fare alcune ulteriori osservazioni:

- è possibile notare una perdita di linearità dei valori alle basse concentrazioni. La motivazione risiede nei criteri di estrazione dei picchi descritti a inizio Capitolo;



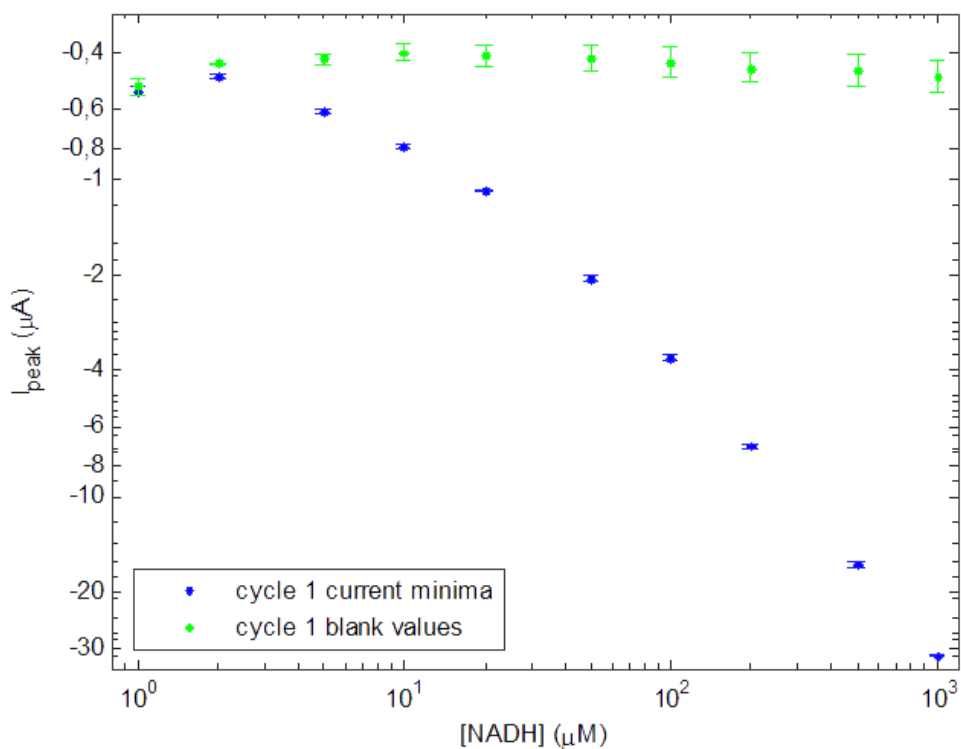


Figura 5.7: NADH in PBS, valori di picco confrontati coi valori di riferimento.

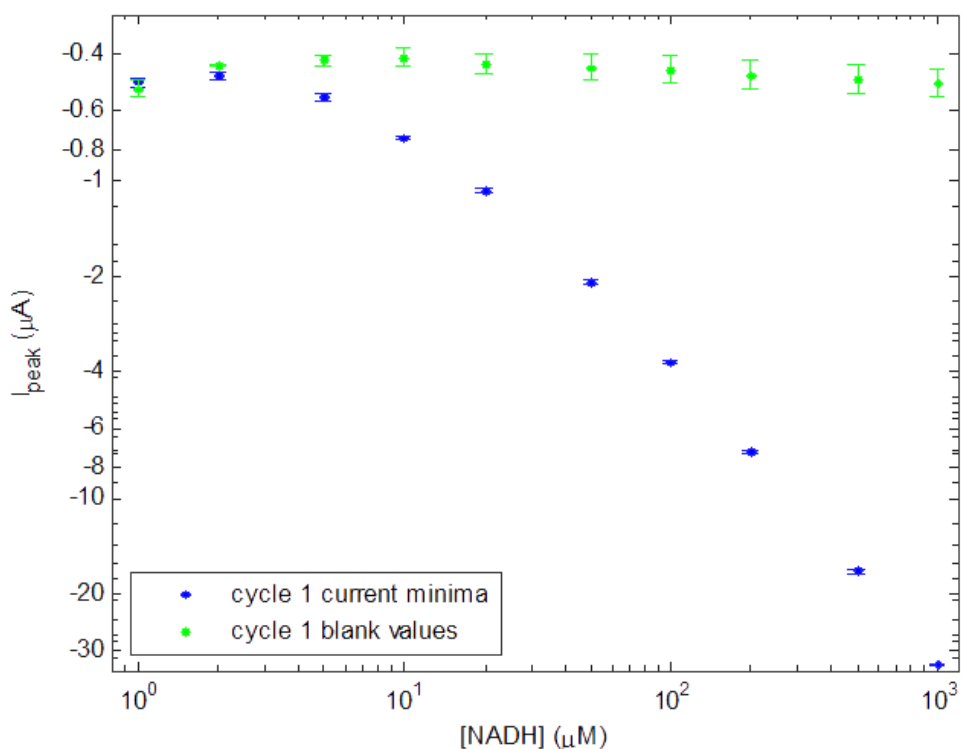


Figura 5.8: NADH in HBRS, valori di picco confrontati coi valori di riferimento.

- gli andamenti sono comparabili, un fatto positivo ricordando che il PBS è stato preso a riferimento come solvente ideale per la sua minima reattività nei confronti degli elettrodi;

- le barre d'errore dei dati dalla concentrazione di  $2 \mu M$  in su non intersecano non solo le barre d'errore delle misure di riferimento (in verticale) ma neppure quelle delle altre concentrazioni di NADH (in orizzontale). Questo implica che è possibile distinguere sia la presenza di NADH rispetto al caso senza analita sia le concentrazioni di NADH tra di loro.

L'operazione conclusiva consiste nella sottrazione del blank dalle curve misurate, dove il DMEM non viene più considerato per i motivi esposti. In seguito alla sottrazione si è provveduto a ricostruire la curva di calibrazione. La Figura 5.9 presenta questi dati. Ripetiamo che si tratta della curva di calibrazione valutata rispetto ai picchi di corrente del primo ciclo, per concentrazioni a partire da  $2 \mu M$  e avendo sottratto i valori di blank.

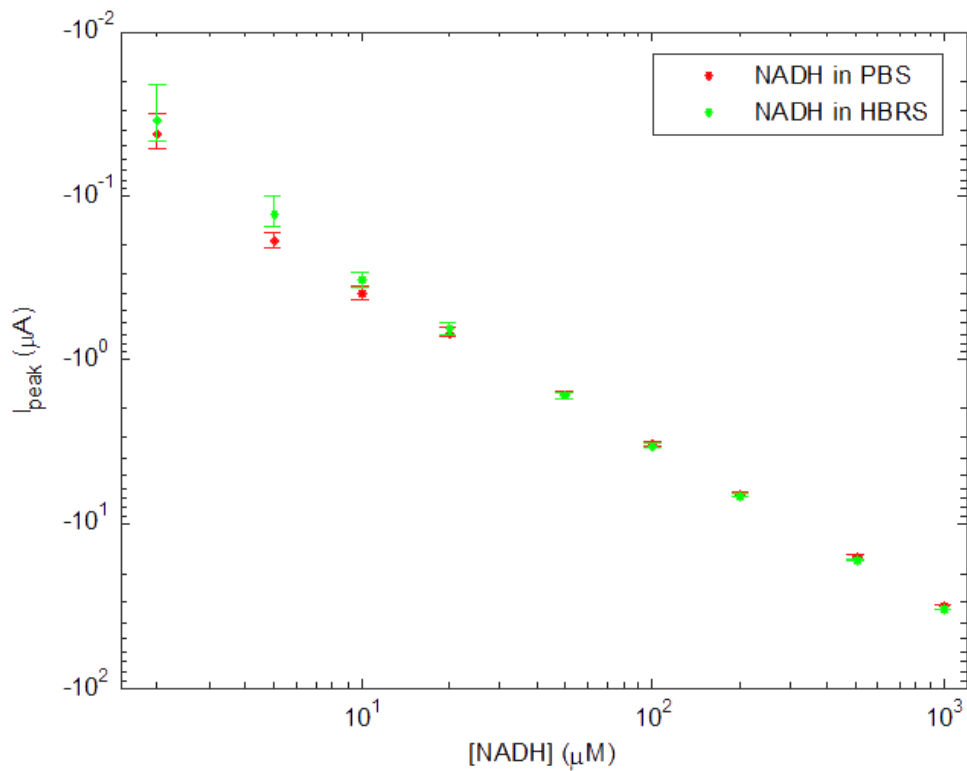


Figura 5.9: NADH in PBS e HBRS, valori di picco estratti dopo sottrazione dei valori di riferimento.

# Capitolo 6

## Conclusioni

Nella presente Tesi sono state svolte delle misure amperometriche su sensore, finalizzate a caratterizzarne il comportamento elettrico in risposta a diversi solventi. Il sensore ha come scopo la rilevazione della molecola NADH disciolta nei solventi oggetto di studio.

Le misure hanno fatto impiego di tre solventi: un tampone salino (PBS), usato come riferimento per la sua non aggressività nei confronti degli elettrodi, un liquido di coltura cellulare (DMEM) e successivamente un tampone di mantenimento cellulare (HBRS). I dati raccolti hanno mostrato che il DMEM presenta due problemi, verosimilmente imputabili alle molecole organiche in esso disciolte:

- è presente un segnale di corrente che interferisce col segnale utile, ostacolando la rilevazione di NADH disciolto in DMEM. Questo fenomeno è stato osservato e studiato mediante misure di ciclovoltammetria;
- è stata rilevata una degradazione della superficie degli elettrodi che attribuiamo ad adsorbimento di molecole. Questo risultato è stato indagato mediante misure di spettroscopia d'impedenza, appoggiandosi a strumenti matematici tipici dell'Ingegneria Elettronica quali i diagrammi di Bode e Nyquist e la modellizzazione attraverso circuiti elettrici equivalenti.

Per superare questi inconvenienti sono state esplorate due vie. Da un lato si è cercato di modellizzare come il degrado degli elettrodi indotto da DMEM si rifletta sulle misure, così da poterlo compensare matematicamente; questo approccio si è rivelato applicabile, tuttavia il DMEM si è confermato in ultima analisi un mezzo difficile per la rilevazione di NADH. Dall'altro è stato indagato un nuovo liquido, il tampone HBRS, al cui interno si riesce a rilevare NADH fino a concentrazioni testate pari a  $2 \mu M$ .



# Capitolo 7

## Prospettive

Vogliamo qui introdurre alcune considerazioni sul futuro del progetto, nel quale abbiamo avuto una parte ma che certo non si esaurisce con il presente lavoro.

Un filone di indagine sul quale si sta lavorando riguarda le questioni connesse al pH. L'enzima LDH ha bisogno di un pH molto alcalino, circa 8.8, per funzionare correttamente; per pH neutri non solo esso non funziona, ma anzi catalizza la reazione opposta a quella di nostro interesse, consumando piruvato e NADH per generare lattato e  $\text{NAD}^+$ . Il problema nasce dal fatto che gli stadi precedenti a quelli di catalisi enzimatica presentano perlopiù valori neutri-acidi di pH: l'urina è acida (valori normali di pH rientrano tra 5.5 e 7.1), il sangue è un sistema tampone capace di mantenere il pH intorno a 7.4, il DMEM è neutro (se ben conservato, altrimenti si alcalinizza fino oltre pH 8). Avviare la catalisi enzimatica in questo ambiente può essere possibile a patto di sostituire DMEM con HBRS (secondo l'approccio descritto nel Capitolo 4) e alcalinizzarlo prima di aggiungere l'enzima LDH. È anche possibile prelevare un campione di lattato in HBRS puro e diluirlo in un buffer alcalino tipo Tris(idrossimetil)amminometano cloridrato (Tris-HCl); questa via comporta però la diluizione ulteriore del lattato, col rischio di scendere al di sotto della soglia di rilevabilità. Gli studi sul Tris-HCl sono ancora in corso e pertanto non sono stati inclusi in questo lavoro; tuttavia possiamo riportare, dagli studi già compiuti, che per la rilevazione di NADH in Tris-HCl si rileva lo stesso comportamento registrato per PBS e HBRS, pertanto non ci aspettiamo ragionevolmente grossi problemi nella rilevazione di NADH in una loro miscela.

Una seconda tematica che dovrà essere oggetto di studio riguarda predisporre un'architettura del sensore che consenta misure differenziali. Bisogna considerare che in condizioni fisiologiche normali il campione biologico può già contenere al suo interno acido lattico; per evitare falsi positivi è necessario che questo contributo venga rilevato prima di passare il campione alla coltura cellulare, e sottratto dal risultato finale. Il problema non si porrà se si deciderà di inserire il campione in DMEM anziché direttamente in HBRS, in quanto come detto si prevede di fare la misura in HBRS lavando via il DMEM e tutto quanto esso contiene. Allo stesso modo bisogna considerare che alcune sostanze classificate come dopanti in alte concentrazioni sono presenti normalmente in bassa concentrazione anche in un organismo sano: il cortisolo è una di queste; la somatopedina C è presente negli organismi giovani nella fase dello sviluppo. Diventa necessario stabilire dei valori di riferimento al di sotto dei quali non si possa parlare di doping.



## Ringraziamenti

Si ringraziano il Professor Alessandro Paccagnella, il Dottor Alessandro De Toni e tutto il gruppo Biodevices per il supporto fornito e l'esperienza altamente formativa vissuta in questi mesi di collaborazione.

I miei ringraziamenti vanno in particolare al Dottor Matteo Scaramuzza per la squisita gentilezza e l'aiuto fornito durante la stesura della presente Tesi.





# Appendici



# Appendice A

## Definizioni e costanti fisiche

### A.1 Definizioni

Si riportano in questa Appendice le definizioni dei termini meno familiari ad uno studente di Ingegneria Elettronica. Non tutti i termini qui elencati sono stati impiegati nel testo: alcuni vengono qui riportati semplicemente perché incontrati di frequente nei testi studiati e dunque potenzialmente utili al lettore.

**Acido** Secondo la prima definizione storica, sostanza che in acqua si dissocia liberando ioni  $H^+$ . Secondo la definizione più moderna, sostanza avente un orbitale libero capace di accettare un doppietto elettronico (coppia di elettroni con spin opposto) da un'altra specie chimica detta base, con la quale instaura un legame dativo.

**Attività** In una soluzione concentrata è possibile e probabile che avvengano interazioni tra molecole; queste vanno a formare stati aggregati transitori e ciò che ne consegue è che esse potrebbero non prendere parte a eventuali reazioni in atto. La concentrazione molare  $[X]$  delle molecole reagenti va quindi sostituita con la concentrazione molare delle molecole effettivamente disponibili a reagire. Questa prende il nome di attività ed è legata alla concentrazione molare secondo la relazione:

$$(A.1) \quad a = \gamma_a [X]$$

dove  $a$  è l'attività e  $\gamma_a$  prende il nome di *coefficiente di attività*. In un sistema ideale  $\gamma_a = 1$  e  $a = [X]$ . Nel caso di sostanze gassose il concetto viene traslato dalle concentrazioni alle pressioni  $P$  e si definisce *fugacità* di un gas la quantità  $f$  legata a  $P$  secondo la relazione:

$$(A.2) \quad f = \phi P$$

dove  $\phi$  è detto *coefficiente di fugacità* e vale  $\phi = 1$  per gas ideali. La relazione (A.2) si estende al caso di pressioni parziali.

**Adsorbimento** Processo attraverso il quale una particella aderisce a una superficie di interfase. Il legame che si instaura può essere elettrostatico come chimico. Il processo contrario è il *desorbimento*. si viene a creare un legame tra una molecola e una superficie

**Analita** La sostanza chimica oggetto di indagine o misura.

**Anione** Ione negativo.

**Anodo** Elettrodo sulla cui superficie avviene una reazione di ossidazione.

**Base** Secondo la prima definizione storica, sostanza che in acqua si dissocia liberando ioni  $OH^-$ . Secondo la definizione più moderna, sostanza capace di donare un doppietto elettronico (coppia di elettroni con spin opposto) a un'altra specie chimica detta acido, con la quale instaura un legame dativo.

**Browniano, moto-** Moto puramente casuale, tipico delle particelle di un fluido e di quelle sospese in un fluido.

**Buffer** v. *Tampone*

**Bulk** Ogni regione di un sistema elettrochimico non interessata dai processi fisico-chimici in corso all'interfaccia elettrodo-soluzione. Si faccia attenzione che una regione di bulk non è necessariamente in equilibrio: ad esempio può essere interessata da flussi di carica; tuttavia non è sede di reazioni redox. In senso lato si dice *regione di bulk* ogni volume sufficientemente lontano dalle superfici da essere isotropo e perlopiù non interessato da scambi di materia o di energia.

**Catalizzatore** Sostanza capace di incrementare la velocità di una reazione abbassandone l'energia di attivazione. Il catalizzatore non viene consumato nel processo.

**Catione** Ione positivo.

**Catodo** Elettrodo sulla cui superficie avviene una reazione di riduzione.

**Coefficiente di attività** v. *Attività*

**Coefficiente di determinazione  $R^2$**  Coefficiente statistico compreso tra 0 e 1 che descrive la bontà di un'interpolazione, dove 0 indica interpolazione assente mentre 1 indica la perfetta sovrapposizione tra la curva interpolante e i dati numerici interpolati.

**Coefficiente stechiometrico** Coefficiente numerico pari in modulo a quello che precede un reagente o un prodotto in una equazione chimica. Esprime la quantità relativa di quella sostanza rispetto alle altre coinvolte nella reazione nell'ipotesi che la reazione sia bilanciata, ovvero che la somma delle masse dei reagenti e dei prodotti sia uguale. In accordo alla definizione IUPAC, i coefficienti stechiometrici vanno intesi come positivi per i prodotti di reazione e negativi per i reagenti.

**Concentrazione molare** Per sostanze disciolte, indica il rapporto tra numero di moli di un soluto e volume occupato dalla soluzione (soluto + solvente). Si misura in [mol/L] o molare [M] oppure in [mol/(vol)] dove (vol) è una qualsiasi unità di misura di volume.

**Controelettrodo (Counter electrode)** Elettrodo costruito in materiale inerte, immerso in soluzione. Consente di chiudere il circuito con l'elettrolita così da far scorrere corrente attraverso il *working electrode*.

**Contro-ione** Ione di carica opposta a quella in esame.

**Controllo cinetico, stadio di-** Lo stadio più lento di un processo e quindi quello che ne determina la cinetica complessiva.

**Corrente capacitiva** Corrente che carica e scarica le capacità associate all'interfaccia in risposta a variazioni della tensione applicata o a variazioni del valore di capacità, per esempio indotte da variazioni di temperatura o dell'area attiva dell'elettrodo.

**Corrente di carica** Corrente dovuta al moto di ioni nella soluzione.

**Corrente faradica** Corrente di elettroni che fluisce all'interfaccia soluzione-elettrodo quale conseguenza di una reazione redox.

**Corrente non faradica** v. *Corrente di carica* e *Corrente capacitiva*

**Desorbimento** v. *Adsorbimento*

**Dissociazione elettrolitica** v. *Elettrolita*

**Elemento** Sostanza mono- o poli-atomica costituita da atomi tutti della stessa specie atomica (ad esempio idrogeno H<sub>2</sub>, ozono O<sub>3</sub>, elio He)

**Elettroattiva, specie-** Specie chimica interessata da reazioni di ossidoriduzione.

**Elettrodo ausiliario (Auxiliary electrode)** v. *Controelettrodo*

**Elettrodo di lavoro (Working electrode)** L'elettrodo interessato dalla reazione elettrochimica.

**Elettrolita** Sostanza che allo stato fuso oppure in soluzione si dissocia in ioni (dissociazione elettrolitica).

**Elettronegatività** Misura della tendenza con cui un atomo in una molecola attrae a sé gli elettroni. In quanto tale è una proprietà non dell'atomo in sé quanto del contesto in cui esso si viene a trovare (quindi della molecola in cui è inserito e dei legami che sviluppa) e persino atomi della stessa specie atomica nella stessa molecola possono avere valori di elettronegatività diversi; tuttavia queste variazioni sono spesso modeste. Trattandosi di un concetto e non di una relazione matematica, l'elettronegatività può essere quantificata attraverso definizioni diverse che portano a scale di misura diverse, la più comune delle quali è la scala di Pauling. L'elettronegatività è un numero puro, viene indicata con la lettera  $\chi$  e tende a crescere spostandosi a destra e verso l'alto sulla tavola periodica degli elementi, con qualche eccezione significativa (alcuni metalli di transizione).

**Energia di attivazione** La minima energia da fornire perché una data reazione chimica possa innescarsi.

**Faradico, processo-** Processo redox nel quale avviene un trasferimento di carica attraverso una superficie.

**Fase chimica** Porzione di un sistema termodinamico avente proprietà fisiche uniformi al suo interno e racchiusa entro una superficie ben definita. A titolo di esempio, un solido e un gas costituiscono due fasi distinte, come pure due liquidi immiscibili.

**Forza ionica** Grandezza fisica che misura la concentrazione totale di ioni presenti in una soluzione.

**Fugacità** v. *Attività*

**Gas perfetto** Gas costituito da molecole puntiformi e non interagenti. Nella pratica, un gas rarefatto a bassa pressione e alta temperatura può essere spesso considerato perfetto.

**Guscio di solvatazione** v. *Raggio idrodinamico*

**Interfaccia (Phase boundary)** Superficie geometrica di separazione tra fasi chimiche distinte. In quanto tale, l'interfaccia è un concetto virtuale e presuppone l'assenza di interazioni tra le due fasi. Si confronti questo concetto con quello di *Interfase*.

**Interfase** Superficie reale di separazione tra fasi chimiche distinte, costituito da un layer (monodimensionale o quasi) formato da molecole delle due fasi e caratterizzato da una chimica diversa da quella dei bulk. Si confronti questo concetto con quello di *Interfaccia*.

**Isotonica, soluzione-** Soluzione in cui la concentrazione di ioni disciolti assume valori coerenti con quelli delle cellule umane, così che se messa in contatto con esse non determina dilatazione o implosione delle stesse. Il fenomeno fisico di riferimento è quello della *pressione osmotica*, qui non riportato.

**Isotopi** Due atomi con pari numero atomico ma diverso numero di massa. Esibiscono le stesse proprietà chimiche ma possono presentare profonde differenze a livello di stabilità (radioattività).

**Layer** Strato.

**Legame dativo** Legame covalente in cui entrambi gli elettroni condivisi provengono dallo stesso atomo.

**Legame di coordinazione** v. *Legame dativo*

**Legame dipolare** v. *Legame dativo*

**Matrice** In chimica, l'insieme delle sostanze costituenti il campione meno l'analita oggetto di studio.

**Metallo di transizione** Ciascun elemento dei gruppi dal 3 al 12 sulla tavola periodica.

**Microstato** Ciascuna delle  $i$  configurazioni microscopiche che un sistema termodinamico può assumere durante le proprie fluttuazioni termiche. Ogni microstato è caratterizzato da un valore  $p_i$  (probabilità che il sistema si venga a trovare in tale microstato) e da un valore di energia. Microstati con la stessa energia sono detti *degeneri*.

**Microstato (non) degeneri** v. *Microstato*

**Molarità** v. *Concentrazione molare*

**Moto laminare** In fluidodinamica, regime di flusso in cui il liquido si muove su strati paralleli (lamine). Le lamine hanno spessore microscopico, non scambiano fluido tra di loro e si muovono a velocità diverse.

**Moto turbolento** In fluidodinamica, regime di flusso in cui il liquido si muove caoticamente. Si accompagna spesso alla presenza di vortici.

**Numero atomico** Il numero di protoni nel nucleo di un atomo. Viene indicato con la lettera  $Z$ .

**Numero di massa** La somma del numero di protoni e neutroni nel nucleo di un atomo. Viene indicato con la lettera A.

**pH** Misura del grado di acidità di una soluzione. Formalmente è definito come  $-\log_{10}(a_{H^+})$ , dove  $a_{H^+}$  è l'attività dello ione idrogeno  $H^+$ .

**Polare, molecola-** Molecola al cui interno la distribuzione degli elettroni non è uniforme intorno ai diversi nuclei, così che essa esibirà localmente una parziale carica positiva o negativa.

**Pressione parziale** La pressione che il gas di una miscela eserciterebbe se fosse l'unico presente nello stesso volume occupato dalla miscela e a pari condizioni di pressione e temperatura.

**Raggio idrodinamico** Una molecola carica in un solvente polare viene circondata da un guscio di molecole del solvente (fenomeno detto *solvatazione* o *idratazione* nel caso in cui il solvente sia acqua). Questa struttura sferica formata da ione e guscio di solvatazione si comporterà come un corpo unico il cui raggio è detto *idrodinamico* e rappresenta la dimensione effettiva del corpo in moto nel solvente.

**Reazione diretta** In una equazione chimica, la reazione che procede dai reagenti verso i prodotti (quindi da sinistra verso destra).

**Reazione endotermica** Reazione che assorbe calore dall'ambiente.

**Reazione esotermica** Reazione che libera calore nell'ambiente.

**Reazione eterogenea** Reazione in cui i reagenti sono presenti in fasi chimiche diverse.

**Reazione inversa** In una equazione chimica, la reazione che procede dai prodotti verso i reagenti (quindi da destra verso sinistra).

**Reazione invertibile** v. *Reazione reversibile*

**Reazione omogenea** Reazione in cui tutti i reagenti sono presenti nella stessa fase chimica.

**Reazione reversibile** Reazione in cui reagenti e prodotti coesistono in una condizione di equilibrio dinamico. Non va confuso col concetto di *trasformazione termodinamica reversibile*.

**Redox** Riferito a reazioni di ossidoriduzione.

**Reversibilità** v. *Reazione reversibile* oppure *Trasformazione termodinamica reversibile*

**Rilassamento, tempo di-** Durata del transitorio sperimentato da un sistema o da una sua porzione per tornare in una configurazione di equilibrio a seguito di una sollecitazione.

**Ripetibilità** Un esperimento è detto *ripetibile* se fornisce gli stessi risultati (entro un certo intervallo di tolleranza) qualora venga rieseguito avendo lasciate invariate le condizioni di misura. Queste includono il misurando, lo strumento di test e il suo stato fisico, il protocollo di misura, l'operatore, le condizioni ambientali. Infine le misure devono essere registrate a breve distanza temporale tra di loro, così che anche la variabile tempo sia il più possibile uniforme tra i due test.

**Riproducibilità** Un esperimento è detto *riproducibile* se fornisce gli stessi risultati (entro un certo intervallo di tolleranza) qualora venga rieseguito variando una o più condizioni di misura. Queste includono il misurando, lo strumento di test e il suo stato fisico, il protocollo di misura, l'operatore, le condizioni ambientali. Infine si parla di condizioni di misura variate anche se le due misure, a parità delle condizioni prima elencate, vengono registrate a una distanza temporale comparabile con le costanti di tempo del sistema. Con l'ultima espressione si intende l'ordine di grandezza temporale delle modifiche, indotte o spontanee, a cui il sistema può andare incontro: ad esempio il tempo medio di degrado di una sostanza se esposta a luce ultravioletta.

**Sale** Composto ionico formato da un acido e una base.

**Scala di Pauling** v. *Elettronegatività*

**Sistema chiuso** Sistema fisico capace di scambiare con l'esterno energia ma non massa.

**Soluzione elettrolitica** v. *Elettrolita*

**Solvatazione** v. *Raggio idrodinamico*

**Sorgente ideale di calore** Sistema fisico ideale capace di mantenere costante la propria temperatura indipendentemente dalla quantità di calore che esso cede o acquista.

**Specie atomica** Ciascun elemento listato nella tavola periodica, differenziato dagli altri per il proprio numero atomico. Ad esempio, il carbonio *C* è la specie atomica avente numero di massa  $Z=6$ . Questa definizione non fa differenze tra isotopi.

**Specie chimica** Qualunque molecola, neutra o ionizzata, di cui siano ben definiti componenti e struttura.

**Spessore di Nernst** v. *Strato di diffusione di Nernst*

**Stato della materia** Ciascuna delle condizioni di aggregazione in cui può trovarsi una fase chimica. I più comuni (ma non gli unici possibili) sono gli stati solido, liquido e gassoso. Qualora necessario in una equazione chimica, è possibile indicare lo stato in cui si trovano reagenti e prodotti attraverso sigle scritte tra parentesi tonde a destra della specie chimica cui si riferiscono; possono essere presenti sigle personalizzate per alcuni sottocasi di interesse, come le amalgame (Tabella A.1).

(aq)	soluzione acquosa
(Hg)	amalgama (lega di mercurio)
(g)	gas
(l)	liquido
(m)	metallo
(s)	solido

Tabella A.1: Sigle impiegate nelle equazioni chimiche in associazione allo stato di reagenti o prodotti.

**Stato di aggregazione** v. *Stato della materia*

**Stato stazionario, sistema in-** Sistema le cui proprietà non cambiano nel tempo.



**Stato termodinamico** Ciascun set di valori delle funzioni di stato macroscopiche che descrivono un sistema termodinamico, tali da identificarne lo stato in modo univoco. Per un sistema termodinamico le tipiche funzioni coinvolte sono Pressione, Volume, Temperatura, Entropia.

**Strato di diffusione di Nernst** Strato virtuale impiegato come modello approssimante per descrivere un fenomeno di diffusione. Con riferimento alla Figura A.1, detta  $\delta$  la distanza entro cui un fenomeno diffusivo si esaurisce si può approssimare il profilo di concentrazione della specie diffondente a lineare (con un gradiente dato dal valore della derivata nel punto di origine del sistema). Questo nuovo strato, che termina dove la concentrazione linearizzata raggiunge il valore di riposo, ha spessore  $\delta_N$  detto *di Nernst*.

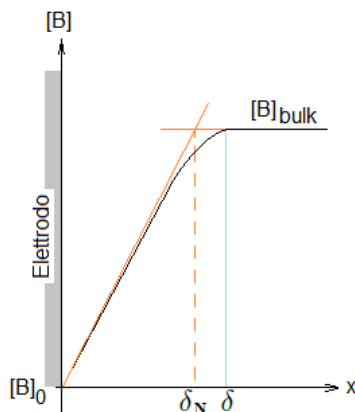


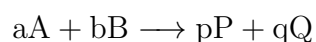
Figura A.1: Resa grafica dei concetti di strato di diffusione di Nernst e spessore di Nernst.

**Tampone** Soluzione che tende a mantenere costante il pH qualora altre sostanze siano addizionate. Questa proprietà, com'è intuitivo, è vera entro certi limiti quantificati dal *potere tampone* della soluzione in esame.

**Tasso di reazione** *v. Velocità di reazione*

**Trasformazione termodinamica reversibile** Trasformazione termodinamica tale che può essere ripercorsa a ritroso, ripassando per gli stessi stati termodinamici e lasciando inalterata l'entropia complessiva del sistema e dell'ambiente. Non va confuso col concetto di *reazione reversibile*.

**Velocità di reazione (reaction rate)** Grandezza fisica che descrive la velocità di avanzamento di una reazione chimica in un sistema chiuso a volume costante. È definita come il modulo del tasso di variazione temporale (ovvero della derivata  $\frac{\partial}{\partial t}$ ) della concentrazione molare di reagenti e prodotti coinvolti. Trasposto in simboli, data l'equazione chimica



la velocità di reazione è definita come  $r = -\frac{1}{a} \frac{\partial[A]}{\partial t} = -\frac{1}{b} \frac{\partial[B]}{\partial t} = \frac{1}{p} \frac{\partial[P]}{\partial t} = \frac{1}{q} \frac{\partial[Q]}{\partial t}$ , avendo posto -a, -b, p, q coefficienti stechiometrici di reagenti e prodotti e [X] le rispettive concentrazioni molarie. L'unità di misura della velocità di reazione è  $[\text{mol}/(\text{L} \cdot \text{s})]$ .

## A.2 Tavola delle costanti fisiche

Simbolo	Nome	Valore
$e$	Numero di Nepero	2.71828..
$F$	Costante di Faraday	96485.309 C mol <sup>-1</sup>
$k_B$	Costante di Boltzmann	1.3806488 · 10 <sup>-23</sup> J K <sup>-1</sup> = = 8.6173324 · 10 <sup>-5</sup> eVK <sup>-1</sup>
$N_A$	Numero di Avogadro	6.02214129 · 10 <sup>23</sup> mol <sup>-1</sup>
$q$	Quanto elementare di carica	1.602176565 · 10 <sup>-19</sup> C
$R$	Costante universale dei gas	8.314472 J mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup>

Tabella A.2: Costanti fisiche impiegate nella presente Tesi.

La costante di Faraday  $F$  è pari alla carica di una mole di cariche elementari  $e$ . Il numero di Avogadro  $N_A$  definisce la quantità di elementi (ioni, atomi, stelle) contenuti in una mole di quegli elementi.

# Appendice B

## Derivazione matematica dell'elemento di Warburg

L'elemento di Warburg modella il comportamento del sistema in risposta a un segnale periodico sinusoidale. Applicando un segnale AC ad un elettrodo la concentrazione delle specie in soluzione varia con lo stesso andamento, e si viene a creare un'onda di concentrazione. La viscosità della soluzione smorza l'ampiezza di quest'onda al crescere della distanza dall'interfaccia, effetto modellizzabile con una resistenza di smorzamento. In alta frequenza il tempo di risposta del sistema arriva ad essere superiore al tempo di sollecitazione così che l'onda si smorza rapidamente e resta confinata nelle immediate vicinanze dell'elettrodo (cala lo spessore di penetrazione nella soluzione); conseguentemente cresce il gradiente di concentrazione istantaneo all'interfaccia e quindi (Capitolo 1.5.1) aumenta la corrente di diffusione. Detto altrimenti l'impedenza cala al crescere della frequenza, come succede nei condensatori.

L'espressione esatta dell'impedenza di Warburg mostra un andamento proporzionale all'inverso della radice quadrata della frequenza e richiede la soluzione esatta del problema di diffusione, che ci sforzeremo di presentare nelle prossime pagine.

### Impedenza di diffusione in un mezzo semi-infinito

Si consideri un sistema elettrochimico contenente una specie redox libera di diffondere in un mezzo non delimitato (semi-infinito), o comunque tale che la diffusione sia dominata da una sola tra più specie compresenti. Tale specie prende il nome di *mediatore*. Detta  $c(x, t)$  la sua concentrazione molare ( $\text{mol}/\text{m}^3$ ) possiamo scrivere:

$$(B.1) \quad c(x, t) = c(x, 0) + \Delta c(x, t)$$

Ci proponiamo di studiare l'*impedenza di diffusione* o *di Warburg* associata a questo sistema nella condizione in cui venga introdotta una piccola variazione oscillante della concentrazione, perturbazione ottenuta applicando una piccola tensione alternata (dell'ordine dei millivolt) agli elettrodi.

Riprendendo l'equazione di Nernst (1.9) per coefficienti stechiometrici in modulo unitari e valutandone la differenza tra i tempi  $t$  generico e  $t = 0$  si ricava:

$$(B.2) \quad \Delta E \stackrel{1.9}{=} \frac{RT}{nF} \ln \left( \frac{c(x, 0) + \Delta c(x, t)}{c(x, 0)} \right) = \frac{RT}{nF} \ln \left( 1 + \frac{\Delta c(x, t)}{c(x, 0)} \right)$$

che può essere linearizzata come:

$$(B.3) \quad \Delta E = \frac{RT}{nF} \frac{\Delta c(x, t)}{c(x, 0)}$$

ricordando che  $\Delta c(x, t) \ll c(x, 0)$  (ipotesi di piccola perturbazione) e che in tale condizione è applicabile lo sviluppo di McLaurin troncato al primo termine  $\ln(1+x) \stackrel{0}{\sim} x$ .

La corrente associata al processo di diffusione è ricavabile mettendo a sistema le relazioni (1.26) e (1.28). Va ricordato che quello di nostro interesse è un flusso di elettroni (si consideri che nella reazione redox bilanciata ne vengano scambiati  $n$ ) e dunque la generica specie diffondente  $B$  di concentrazione  $[B](mol/m^3)$  va studiata come una concentrazione di elettroni  $n[B]$ , che per coerenza con la notazione introdotta indicheremo come  $nc(x, t)$ . Se ne ricava:

$$(B.4) \quad i(t) \stackrel{1.26}{=} \stackrel{1.28}{=} -nAFD \left. \frac{\partial c(x, t)}{\partial x} \right|_{(x=0)}$$

dove  $i(t)$  è la corrente che fluisce all'elettrodo di area  $A$  posto in  $x=0$ ,  $F$  la costante di Faraday e  $D$  la diffusività della specie redox. Di nuovo è possibile valutare la differenza tra i tempi  $t$  generico e  $t = 0$  ricavando:

$$(B.5) \quad \Delta i(t) \stackrel{B.1}{=} -nAFD \left. \frac{\partial \Delta c(x, t)}{\partial x} \right|_{(x=0)}$$

Avendo posto queste premesse possiamo cercare di risolvere l'equazione (1.30) nel nostro sistema. Per farlo ci spostiamo nel dominio delle trasformate di Laplace, valutate rispetto alla variabile tempo, così che la relazione (1.30):

$$(B.6) \quad \frac{\partial c(x, t)}{\partial t} = D \frac{\partial^2 c(x, t)}{\partial x^2}$$

attraverso la regola di trasformazione delle derivate:

$$(B.7) \quad \mathcal{L}\{f^{(n)}(t)\} = s^n \mathcal{L}\{f(t)\} - \sum_{i=0}^{n-1} s^{n-1-i} f^{(i)}(0)$$

dove  $s$  è la variabile complessa, diventa:

$$(B.8) \quad \mathcal{L}\left\{\frac{\partial c(x, t)}{\partial t}\right\} \stackrel{B.7}{=} s \mathcal{L}\{c(x, t)\} - c(x, 0) \stackrel{B.6}{=} \mathcal{L}\left\{D \frac{\partial^2 c(x, t)}{\partial x^2}\right\}$$

che facendo uso della (B.1) diventa:

$$(B.9) \quad s \mathcal{L}\{c(x, 0)\} + s \mathcal{L}\{\Delta c(x, t)\} - c(x, 0) = \mathcal{L}\left\{D \frac{\partial^2 c(x, 0)}{\partial x^2}\right\} + \mathcal{L}\left\{D \frac{\partial^2 \Delta c(x, t)}{\partial x^2}\right\}$$

Ricordando che la trasformata di Laplace di una costante  $m$  vale  $m/s$ , e facendo l'ipotesi di stazionarietà (concentrazione uniforme al tempo zero), la (B.9) diventa:

$$(B.10) \quad s \frac{c(x, 0)}{s} + s \mathcal{L}\{\Delta c(x, t)\} - c(x, 0) = \mathcal{L}\left\{D \frac{\partial^2 \Delta c(x, t)}{\partial x^2}\right\}$$

Semplificando  $c(x, 0)$  e per  $D$  costante nel tempo si perviene all'equazione:

$$(B.11) \quad s \Delta C(s) = D \frac{d^2 \Delta C(x, t)}{dx^2}$$

dove si è posto  $\Delta C(s) = \mathcal{L}\{\Delta c(x, t)\}$ . A secondo membro è stato possibile invertire le operazioni di derivazione e trasformazione trattandosi di operatori lineari. La (B.11) è ora un'equazione differenziale omogenea di secondo grado nell'incognita  $\Delta C(s)$  avente equazione omogenea associata  $D\lambda^2 - s = 0$  e soluzione  $\lambda = \pm\sqrt{s/D}$ , da cui:

$$(B.12) \quad \Delta C(s) = A_0 \exp\left(\sqrt{\frac{s}{D}}x\right) + B_0 \exp\left(-\sqrt{\frac{s}{D}}x\right)$$

con  $A_0$  e  $B_0$  costanti da definire. Si osservi che fino a questo punto non abbiamo mai preso in considerazione le condizioni al contorno, e dunque le relazioni (B.1)-(B.12) hanno carattere generale per il nostro sistema indipendentemente dall'estensione spaziale (finita o semi-infinita) della soluzione rispetto all'elettrodo collocato in  $x = 0$ .

Per assegnare un valore alle costanti  $A_0$  e  $B_0$  facciamo uso innanzitutto della condizione al contorno:

$$(B.13) \quad \lim_{x \rightarrow +\infty} \Delta C(s) = 0$$

come lecito porre dal momento che il mediatore è presente in quantità finita in un mezzo di estensione semi-infinita. Applicata alla (B.12) si ricava:

$$(B.14) \quad \lim_{x \rightarrow +\infty} \Delta C(s) \stackrel{B.12}{=} \lim_{x \rightarrow +\infty} A_0 \exp\left(\sqrt{\frac{s}{D}}x\right) + \lim_{x \rightarrow +\infty} B_0 \exp\left(-\sqrt{\frac{s}{D}}x\right) \stackrel{B.13}{=} 0$$

dove il secondo limite a secondo membro è zero mentre il primo tende a divergere per  $A_0$  non nullo, pertanto deve essere  $A_0 = 0$ . La (B.12) si riduce quindi a:

$$(B.15) \quad \Delta C(s) = B_0 \exp\left(-\sqrt{\frac{s}{D}}x\right)$$

Per ricavare il valore di  $B_0$  ci appoggiamo alla trasformata di Laplace, membro a membro, della relazione (B.5):

$$(B.16) \quad \Delta I(s) \stackrel{B.5}{=} -nFAD \frac{d\Delta C(s)}{dx} \Big|_{(x=0)} \stackrel{B.15}{=} -nFAD \left(-B_0 \sqrt{\frac{s}{D}} e^{-\sqrt{s/D}x}\right) \Big|_{(x=0)} = \\ = nFAB_0 \sqrt{sD}$$

in cui si è posto  $\Delta I(s) = \mathcal{L}\{\Delta i(t)\}$  e si ricorda che  $A$  è l'area dell'elettrodo. Se ne ricava che:

$$(B.17) \quad B_0 = \frac{\Delta I(s)}{nFA\sqrt{sD}}$$

da cui la (B.15) assume la forma:

$$(B.18) \quad \Delta C(s) = \frac{\Delta I(s)}{nFA\sqrt{sD}} \exp\left(-\sqrt{\frac{s}{D}}x\right)$$

Siamo giunti quasi alla fine della nostra analisi. Partiamo dalla trasformata di Laplace, membro a membro, della relazione (B.3) e valutiamola nell'origine, dove è situato l'elettrodo (del resto la stessa equazione di Nernst da cui si è ricavata la (B.3) ha senso solo

per una reazione redox, quindi all'elettrodo):

$$(B.19) \quad \mathcal{L}\{\Delta E\} \stackrel{B.18}{=} \frac{RT}{nFc(x,0)} \frac{\Delta I(s)}{nFA\sqrt{sD}} e^{-\sqrt{s/D}x} \Big|_{(x=0)} = \frac{RT}{(nF)^2 c_0} \frac{\Delta I(s)}{A\sqrt{sD}}$$

dove si è posto  $c_0 = c(0,0)$ . A questo punto possiamo finalmente calcolare l'impedenza di diffusione  $Z(s)$  nel caso di mezzo semi-infinito:

$$(B.20) \quad Z(s) = \frac{\mathcal{L}\{\Delta E\}}{\Delta I(s)} \stackrel{B.19}{=} \frac{RT}{(nF)^2 c_0} \frac{1}{A\sqrt{sD}}$$

Cerchiamo ora di esprimere in termini più semplici la relazione appena trovata. Innanzitutto riportiamo in frequenza l'espressione (B.20) sostituendo la variabile complessa  $s$  con  $s = jw$ , dove  $j$  è l'unità immaginaria. Ricordando che:

$$(B.21) \quad \sqrt{j} = \pm \frac{1}{\sqrt{2}}(1 + j)$$

si può elaborare il termine  $1/\sqrt{sD}$  ottenendo, in seguito a razionalizzazione del denominatore complesso:

$$(B.22) \quad \frac{1}{\sqrt{sD}} = \frac{1}{\sqrt{jwD}} \stackrel{B.21}{=} \pm \frac{1}{\sqrt{wD}} \frac{\sqrt{2}}{1+j} = \pm \frac{1}{\sqrt{wD}} \frac{\sqrt{2}(1-j)}{2} = \pm \frac{1}{\sqrt{wD}} \frac{1}{\sqrt{2}}(1-j)$$

Questo risultato, inserito nella (B.20), consente di scrivere:

$$(B.23) \quad Z(jw) \stackrel{B.20}{=} \pm \frac{RT}{(nF)^2 c_0 A \sqrt{2D} \sqrt{w}} (1-j)$$

Chiamando:

$$(B.24) \quad Z_W \triangleq \frac{RT}{(nF)^2 c_0 A \sqrt{2D}} > 0$$

possiamo riscrivere la (B.23) come:

$$(B.25) \quad Z(jw) \stackrel{B.23}{=} \pm \left( \frac{Z_W}{\sqrt{w}} - j \frac{Z_W}{\sqrt{w}} \right) = \pm \left( \frac{Z_W}{\sqrt{w}} + \frac{Z_W}{j\sqrt{w}} \right)$$

A questo punto è possibile escludere il caso negativo in quanto è poco sensato in questo contesto assumere che la parte reale (resistiva) possa essere negativa. La (B.25) diventa quindi:

$$(B.26) \quad Z(jw) = \left( \frac{Z_W}{\sqrt{w}} + \frac{Z_W}{j\sqrt{w}} \right) = \frac{Z_W}{\sqrt{w}} (1-j)$$

avente modulo e fase pari rispettivamente a:

$$(B.27) \quad |Z(jw)| = \sqrt{2} \frac{Z_W}{\sqrt{w}}$$

$$(B.28) \quad \angle Z(jw) \equiv \angle(1-j) = -45^\circ$$

Si osservi la presenza di un termine reale ( $Z_W/\sqrt{w}$ ) che esprime la resistenza di smorzamento introdotta nelle prime righe di sezione 2.3.2.2. Una nota: per agevolare il confronto tra questa e altre impedenze calcolate nel testo segnaliamo che la forma compatta della (B.26), senza il calcolo esplicito di  $\sqrt{j}$ , è:

$$(B.29) \quad Z(jw) \stackrel{B.22}{=} \sqrt{2} \frac{Z_W}{\sqrt{jw}} \stackrel{B.26}{=}$$

Vogliamo ora rendere graficamente il comportamento in frequenza di questo elemento. Per farlo ci avvaliamo dei diagrammi di Bode e Nyquist, estensivamente impiegati in spettroscopia d'impedenza (la tecnica è descritta più nel dettaglio nel Capitolo 2.2) e ben noti anche al lettore proveniente da un percorso di studi in Ingegneria Elettronica, con una avvertenza: i diagrammi di Bode impiegati in elettrochimica non sono espressi in decibel; semplicemente, per riportare il modulo di una impedenza ci si limita a fare uso della scala doppio-logaritmica (quindi logaritmica in ascissa e ordinata). Si ricorda inoltre che nel diagramma di Nyquist è consuetudine indicare inizio e fine del diagramma (ovvero i punti corrispondenti a  $w = 0$  e  $w \rightarrow \infty$ ) con i simboli  $w_0$  e  $w_\infty$ .

Dal momento che l'impedenza di diffusione contiene un termine costante in frequenza ma non noto a priori, ovvero  $Z_W$ , decidiamo di valutarne il comportamento in frequenza previa normalizzazione rispetto a tutti i termini costanti; con riferimento alla (B.29) analizziamo quindi l'impedenza normalizzata  $Z_{norm} \triangleq 1/\sqrt{jw}$  pari a  $Z(jw)/(\sqrt{2}Z_W)$ . La Figura B.1 riassume i diagrammi relativi; come già osservato, la fase è costante e vale  $-45^\circ$  (la normalizzazione rispetto a costanti positive non altera la fase). Va osservato che

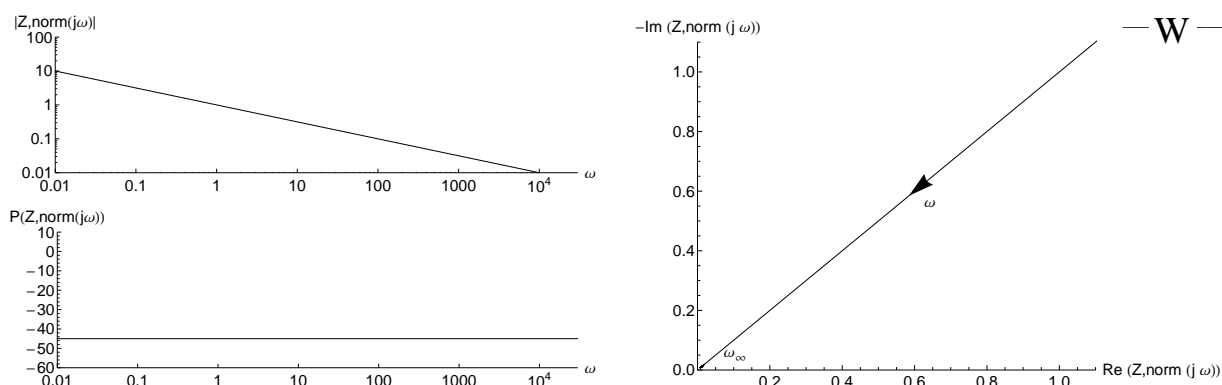


Figura B.1: Elemento di Warburg per mezzo semi-infinito, impedenza normalizzata alle costanti; diagrammi di Bode e Nyquist. In alto a destra: simbolo circuitale dell'elemento Warburg. Grafici realizzati mediante Mathematica 8.0.1.

in alta frequenza l'impedenza di Warburg diventa trascurabile.

### Impedenza di diffusione in un mezzo di spessore finito

In molti casi lo spessore del mezzo interessato dal fenomeno diffusivo è finito. Detto  $L$  tale spessore si individuano due casi limite di interesse, determinati dalle condizioni al contorno del sistema:

1. alla distanza  $x = L$  non vi sono barriere al trasferimento di specie redox (elettroattive). In  $x = L$  è nullo l'eccesso di concentrazione della specie diffondente rispetto a  $c_0$  ma non la derivata calcolata nella coordinata spaziale. Questo caso è definito di *diffusione finita trasmissiva* o *conduttiva* (*open* o *transmissive boundary finite-length diffusion* in letteratura scientifica) ed è descritta dal cosiddetto *elemento Warburg short*. Un esempio è rappresentato dall'elettrodo a disco rotante (Figura 1.8) per

il quale lo spessore  $L$  è determinato dalla velocità di rotazione del disco e quindi può non coincidere con l'effettivo spessore della soluzione. Segnaliamo che in sistemi di questo tipo è possibile riferirsi a una lunghezza caratteristica detta *spessore di Nernst* anziché al parametro  $L$ ; la definizione esatta di spessore di Nernst è riportata in Appendice A.1.

2. alla distanza  $x = L$  non è possibile alcun trasferimento di specie elettroattive. In  $x = L$  sono nulle sia l'eccesso di concentrazione della specie diffondente che la derivata nella coordinata spaziale. Si parla in questo caso di *diffusione finita riflessiva* (*blocking* o *reflecting boundary finite-length diffusion*) descritta dall'*elemento Warburg open*.

L'espressione matematica di questi due elementi riprende i calcoli svolti nella precedente sezione (diffusione in un mezzo semi-infinito) semplicemente variando le condizioni al contorno.

Nel primo caso la condizione (B.13) viene sostituita da:

$$(B.30) \quad \lim_{x \rightarrow L} \Delta C(s) = 0$$

I passaggi matematici successivi ricalcano nella forma le relazioni da (B.14) a (B.19). Il risultato a cui si perviene è:

$$(B.31) \quad Z_s(jw) = \frac{\sqrt{2}Z_W}{\sqrt{jw}} \tanh\left(\sqrt{\frac{jw}{D}}L\right)$$

dove  $Z_W$  è stata definita in precedenza nel testo (relazione (B.24)). Vogliamo ora indagare il comportamento in frequenza di questo elemento. Definiamo per nostra comodità:

$$(B.32) \quad w_1 = \frac{wL^2}{D}$$

così da poter esprimere la (B.31) come:

$$(B.33) \quad Z_s(jw_1) \stackrel{B.31}{=} Z_W L \sqrt{\frac{2}{D}} \frac{1}{\sqrt{jw_1}} \tanh(\sqrt{jw_1})$$

e studiamo la componente variabile in frequenza della (B.33), ovvero:

$$(B.34) \quad Z_{s,norm}(jw_1) = \frac{1}{\sqrt{jw_1}} \tanh(\sqrt{jw_1})$$

corrispondente all'aver normalizzato  $Z_s(jw)$  per la costante  $Z_W L \sqrt{2/D}$ . Possiamo osservare che:

$$(B.35) \quad \frac{1}{\sqrt{jw_1}} \tanh(\sqrt{jw_1}) = \begin{cases} \frac{1}{\sqrt{jw_1}} & w_1 \gg 1 \\ 1 & w_1 \ll 1 \end{cases}$$

dove per la prima relazione si è fatto uso del fatto che  $\tanh(x) \xrightarrow{x \rightarrow \infty} 1$  mentre per la seconda si è applicato lo sviluppo di McLaurin della tangente iperbolica  $\tanh(x) \stackrel{0}{\sim} x - x^3/3 + \dots$ . La (??) in ultima analisi ci informa che l'elemento Warburg short si comporta come una resistenza in bassa frequenza e come un elemento Warburg semplice in alta frequenza (a meno di un fattore  $L/\sqrt{D}$  - si veda la relazione (B.29), ricordando che per un confronto



bisogna prima denormalizzare la (??)). La Figura B.2 riporta i diagrammi di Bode e Nyquist per l'elemento Warburg short normalizzato (relazione (B.34)).

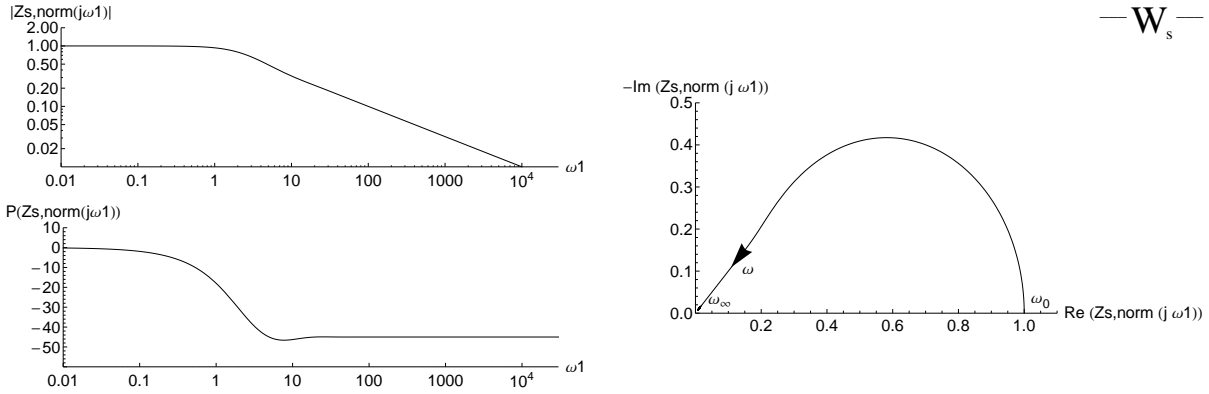


Figura B.2: Elemento Warburg short, impedenza normalizzata alle costanti; diagrammi di Bode e Nyquist. In alto a destra: simbolo circuitale dell'elemento Warburg short. Grafici realizzati mediante Mathematica 8.0.1.

Segnaliamo che per meglio descrivere i dati sperimentali (argomento ripreso in sezione 2.3.3) è stato sviluppato un elemento che generalizza il Warburg short di equazione (B.33). Questo prende il nome di *Generalized Finite Warburg element (GFW)* in letteratura ed è descritto dalla relazione matematica:

$$(B.36) \quad Z_s(jw_1) = Z_W L \sqrt{\frac{2}{D}} \frac{1}{(jw_1)^n} \tanh(jw_1)^n, \quad 0 \leq n \leq 1$$

dove per  $n = 0.5$  si ritrova l'elemento Warburg short standard. In generale il comportamento dell'elemento GFW ricalca quello del Warburg short; il diagramma di Nyquist uscirà dall'origine con pendenza inferiore a  $45^\circ$  per  $n < 0.5$  e superiore per  $n > 0.5$ . Sottolineiamo che per valori di  $n$  superiori a 0.78 questo elemento acquista caratteristiche peculiari (evidenziate dal Nyquist che inizia a richiudersi su se stesso formando delle asole).

Riprendiamo ora il secondo dei casi elencati all'inizio di questa sezione: l'elemento Warburg open. Esattamente come per il Warburg short è possibile riprendere i calcoli svolti nella precedente sezione (diffusione in un mezzo semi-infinito) sostituendo la condizione al contorno (B.13) con:

$$(B.37) \quad \lim_{x \rightarrow L} \frac{\partial \Delta C(s)}{\partial x} = 0$$

Di nuovo si ripercorrono i passaggi matematici espressi dalle relazioni da (B.14) a (B.19). Il risultato a cui si perviene è:

$$(B.38) \quad Z_o(jw) = \frac{\sqrt{2}Z_W}{\sqrt{jw}} \coth \left( \sqrt{\frac{jw}{D}} L \right)$$

che facendo uso della (B.32) può essere riscritta come:

$$(B.39) \quad Z_o(jw) \stackrel{B.32}{=} \stackrel{B.38}{=} Z_W L \sqrt{\frac{2}{D}} \frac{1}{\sqrt{jw_1}} \coth(\sqrt{jw_1})$$

La componente  $Z_{o,norm}(j\omega_1)$  variabile in frequenza si ottiene dalla normalizzazione di  $Z_o(j\omega)$  per  $Z_W L\sqrt{2/D}$ . Possiamo osservare che:

$$(B.40) \quad Z_{o,norm}(j\omega_1) = \frac{1}{\sqrt{j\omega_1}} \coth(\sqrt{j\omega_1}) = \begin{cases} \frac{1}{\sqrt{j\omega_1}} & \omega_1 \gg 1 \\ \frac{1}{j\omega_1} + \frac{1}{3} - \dots & \omega_1 \ll 1 \end{cases}$$

dove per la prima relazione si è fatto uso del fatto che  $\coth(x) \xrightarrow{x \rightarrow \infty} 1$  mentre per la seconda si è applicato lo sviluppo di McLaurin della cotangente iperbolica  $\coth(x) \overset{0}{\sim} 1/x + x/3 - \dots$ . La (B.40) ci comunica che l'elemento Warburg open si comporta come una serie RC in bassa frequenza e come un elemento Warburg semplice in alta frequenza (di nuovo, a meno di un fattore  $L/\sqrt{D}$ ). Segnaliamo che anche di questo elemento esiste una forma generalizzata, ottenibile secondo lo stesso approccio impiegato per scrivere la relazione (B.36).

La Figura B.3 riporta i diagrammi di Bode e Nyquist per l'elemento Warburg open normalizzato (relazione (B.40)).

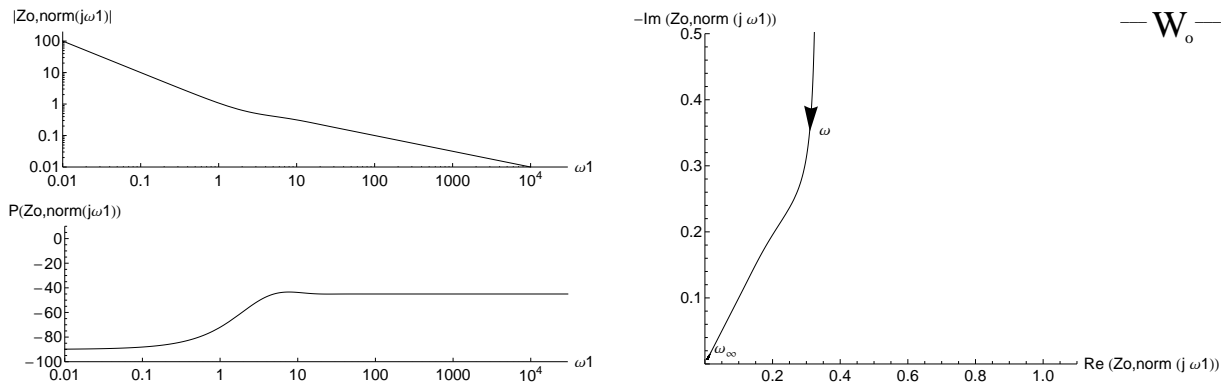


Figura B.3: Elemento Warburg open, impedenza normalizzata alle costanti; diagrammi di Bode e Nyquist. In alto a destra: simbolo circuitale dell'elemento Warburg open. Grafici realizzati mediante Mathematica 8.0.1.

# Appendice C

## Codici Matlab

In questa Appendice riportiamo alcuni degli *script* Matlab sviluppati nel corso dell'attività di Tesi e che possano risultare di interesse al lettore che lavori sulle stesse tematiche.

### C.1 Sequenziamento dei dati di ciclovoltammetria

L'output standard dello strumento CHI440A è costituito da una matrice dati a due colonne (valori di tensione applicata, valori di corrente misurata) e non distingue tra cicli consecutivi; il numero di righe complessive pertanto può raggiungere il centinaio di migliaia. Per gestire questo pacchetto dati è stato sviluppato un semplice script (*definesegm*), concepito per estrarre dalla matrice dati i parametri più significativi per l'analisi, tra cui: numero di righe dati per ogni segmento del ciclovoltammogramma (per ogni *sweep*), numero di righe dati per ogni ciclo, numero di cicli, indice dell'ultima riga dati.

```
function out = definesegm (data)
%INPUT: file .txt di dati solo numerici
%OUTPUT: matrice out =
%          = [rowsegm rowcyc cyclenumber maxindex; Vinit Vmax Vmin step]
Vinit=data(1,1);
Vmax=max(data(:,1));
Vmin=min(data(:,1));
maxindex=size(data,1);

step=abs(data(2,1)-data(1,1)); % passo di calcolo in tensione

rowsegm = round((Vmax-Vmin)/step);
% nota: formalmente sarebbe (Vmax-Vmin+1)/step, ma per come gestisco
% i dati negli altri script preferisco lavorare con questo valore. round() e'
% necessario altrimenti rowsegm e' visto come double anziche' integer e crea
% problemi se usato come indice di cicli for

rowcyc = 2*rowsegm;
cyclenumber = round(maxindex/rowcyc);

out = [rowsegm rowcyc cyclenumber maxindex; Vinit Vmax Vmin step];
end
```

Questi parametri possono essere impiegati per sequenziare il pacchetto dati all'interno di altri script. Ad esempio si ha che:

- il ciclo N ha indici di riga da  $\text{rowcyc}*(N-1)+1$  a  $\text{rowcyc}*N+1$  (la notazione grafica è quella impiegata in Matlab)

- l'N-esimo segmento pari ha indici di riga da  $\text{rowsegm}*(N-1)+1$  a  $\text{rowsegm}*N+1$  con N pari. Scrivendo  $N=2n$ ,  $n=1,2,3,\dots$  si ottiene di riferirsi agli indici da  $\text{rowsegm}*(2*n-1)+1$  a  $\text{rowsegm}*2*n+1$ ;
- l'N-esimo segmento dispari ha indici di riga da  $\text{rowsegm}*(N-1)+1$  a  $\text{rowsegm}*N+1$  con N dispari. Scrivendo  $N=2n-1$ ,  $n=1,2,3,\dots$  si ottiene di riferirsi agli indici da  $\text{rowsegm}*(2*n-2)+1$  a  $\text{rowsegm}*(2*n-1)+1$ .

## C.2 Tracce ciclovoltammetriche: tracciamento dinamico dei minimi locali

Alcune misure di ciclovoltammetria possono prevedere molti cicli consecutivi dell'onda triangolare di tensione data in ingresso al sistema. In questa situazione è possibile che il segnale di corrente misurato non si assesti su una traccia stabile e presenti invece uno spostamento (*drift*) continuo della posizione dei picchi. L'algoritmo iterativo che segue (*movingmin*) è stato sviluppato per tracciare dinamicamente la posizione dei minimi locali nel ciclovoltammogramma; fornendo come input la posizione approssimativa del primo picco (quello del primo ciclo) e un intervallo in tensione entro cui cercare il secondo, l'algoritmo:

1. calcola la posizione esatta del primo picco;
2. si sposta sul secondo ciclo a pari valore di tensione (ascissa) e cerca il picco entro l'intervallo definito;
3. qualora non lo trovi, allarga l'intervallo di ricerca;
4. individuato il picco, reimposta l'intervallo di ricerca predefinito e identifica la posizione del picco trovato come nuovo punto di partenza per la ricerca del picco successivo. In alternativa l'algoritmo può non trovare alcun picco (condizione di monotonia della traccia) e arrestarsi. L'esecuzione si arresta comunque raggiunto l'ultimo ciclo.

Potendo essere le tracce monotone si è previsto di ignorare picchi individuati agli estremi dell'intervallo di ricerca. Inoltre, essendo le tracce spesso affette da rumore in alta frequenza, si è previsto di ignorare anche i picchi individuati troppo vicino agli estremi dell'intervallo di ricerca, entro qualche millivolt.

Nei commenti al codice si parla di indici di riga *globali* per indicare quelli della matrice dati passata in input, così che l'indice 1 indica effettivamente la prima riga dati; si parla di indici di riga *locali* per indicare quelli di porzioni della matrice dati elaborate separatamente, così che l'indice 1 di queste sottomatrici non corrisponde all'indice 1 della matrice dati di partenza.

```
function out = movingmin( data, peakv, deltav, flag )
% INPUT: matrice dati, valore approssimato (in volt) del picco ( = minimo
% locale) del PRIMO ciclo, valore minimo (in volt) dell'intorno entro cui
% spostarsi per la ricerca dei minimi successivi.
% Flag: se = 0 indica il regolare funzionamento della function. Chiamare la
% function con flag = 1 e' pensato per uso interno (la function e' ricorsiva)
% e indica che peakv e deltav sono gia' indici della matrice e non valori di
% tensione.
% OUTPUT: matrice [localmin current, localmin potential, indici matrice (per
% uso interno alla ricorsione)].
```

```

langdsout=langds(data);
    %langds OUTPUT: [rowsegm  rowcyc  cyclenumber  maxindex
    %                   Vinit    Vmax      Vmin      step    ]
rowsegm=langdsout(1,1);
rowcyc=langdsout(1,2);
cyclenumber=langdsout(1,3);
maxindex=langdsout(1,4);
stepv=langdsout(2,4);
    minstepv = 10*stepv;

persistent getout; %visibile anche nelle istanze generate per ricorsione
getout = 0;

%definisco l'intervallo entro cui cercare il minimo
if flag == 0
    if deltav < minstepv
        deltav = minstepv;
        disp(horzcat('Too low voltage delta. Value increased to ',...
            num2str(minstepv)));
    end
    delta=round(deltav/stepv);
else
    delta=deltav; %se flag =1 sto gia' ragionando con intervalli di indici
                %e non di tensione
end

% Per Vinit = Vhigh i minimi assoluti vanno calcolati sui soli segmenti PARI
% di indici da rowsegm*(N-1)+1 a rowsegm*N+1 con N pari (scrivo N
% come N=2n, n=1,2,3...). Qualora sia Vinit = Vlow, sostituire la
% definizione di lowerbound e higherbound rispettivamente con 1 e
% rowsegm+1
if flag == 0
    start = -1;
    lowerbound = rowsegm+1; % boundaries del primo segmento PARI
    higherbound = rowsegm*2+1;
    for ind = lowerbound:higherbound % cerco peakv nel primo segmento pari...
        if (data(ind,1) == peakv)
            start = ind; % ...e recupero l'indice associato
            %NB: start e' inizializzato con un valore di indice del primo
            %ciclo, "globale", non scalato di un segmento.
            break;
        end
    end
    if (start == -1)
        disp('Cannot find start point');
    end
else
    start = peakv; %se flag =1 sto gia' ragionando con un valore di indice
                %e non di tensione
end

localmin_i=zeros(1,cyclenumber); %prealloco spazio per le matrici
localmin_v=zeros(1,cyclenumber);
localmin_index=zeros(1,cyclenumber);

scarto = 4;

% Eseguo la ricerca dei minimi
lastdata=cyclenumber;

```

```

for n=1:cyclenumber

    if getout == 1
        %Se l'ultima iterazione avente un massimo era la 18 (n=18),
        %durante il ciclo for con n=19 ho posto getout = 1 nel blocco elseif
        %e il successivo comando continue mi ha passato a n=20; quindi
        %ho dati non nulli fino all'indice n-2
            lastdata=n-2;
            break;
    end

    lowerbound = rowsegm*(2*n-1)+1;    % lowerbound e' indice globale
    higherbound = rowsegm*2*n+1;      % higherbound e' indice globale
    % Qualora sia Vinit = Vlow, sostituire la definizione di lowerbound e
    % higherbound rispettivamente con rowsegm*(2*n-2)+1 e rowsegm*(2*n-1)+1

    if higherbound > maxindex
        higherbound=maxindex;
    end

    low = start - delta;    % valori dell'intorno definito da start e delta.
                            % low e high sono indici globali

    if low < lowerbound
        low = lowerbound;
    end

    high = start + delta;
    if high > higherbound
        high = higherbound;
    end

    % NB e' necessario che START sia un indice GLOBALE anche nelle
    % chiamate ricorsive
    [curr, potindex]=min(data(low:high,2));
                            %NB: potindex e' indice locale dentro data(low:high),
                            % (se potindex = 1 il minimo e' su low)
    %converto potindex a indice globale:
    potindex = low + potindex - 1;

    %Devo garantirmi che il min sia ragionevolmente lontano dagli estremi:
    if (potindex < high - scarto)&&(potindex > low + scarto)
        localmin_i(n)=curr;
        localmin_v(n)=data(potindex,1);
        localmin_index(n)=potindex;
        start = potindex + rowcyc;    %start e' un indice globale

    elseif high-low == rowsegm
        %funzione monotona, mi fermo e interrompo
        %ogni istanza. Uso la variabile globale getout
        getout = 1;
        continue;
        %passa alla prossima iterazione del ciclo for. Getout
        %provvedera a uscirne

    else    %se non intercetto il minimo devo allargare il range
        %di osservazione. Richiamo movingmin con delta
        %incrementato di 5*scarto

        temp = movingmin(data(rowcyc*(n-1)+1:rowcyc*n+1,:),...
                            start-(n-1)*rowcyc,delta+5*scarto,1);
        localmin_i(n)=temp(1,1);

```

```

localmin_v(n)=temp(2,1);
localmin_index(n)=temp(3,1);

%Dal valore di potindex ottenuto dalla chiamata iterativa aggiorno
%il valore di start per la successiva iterazione del ciclo for.
%NB: devo avanzare di un ciclo
start = temp(3,1)+n*rowcyc;
end

end

out = [localmin_i(1:lastdata);localmin_v(1:lastdata);...
      localmin_index(1:lastdata)];

end

```

I dati estratti possono essere impiegati per tracciare un grafico che evidenzi ciclo per ciclo la posizione dei minimi locali. Un esempio è riportato in Figura C.1.

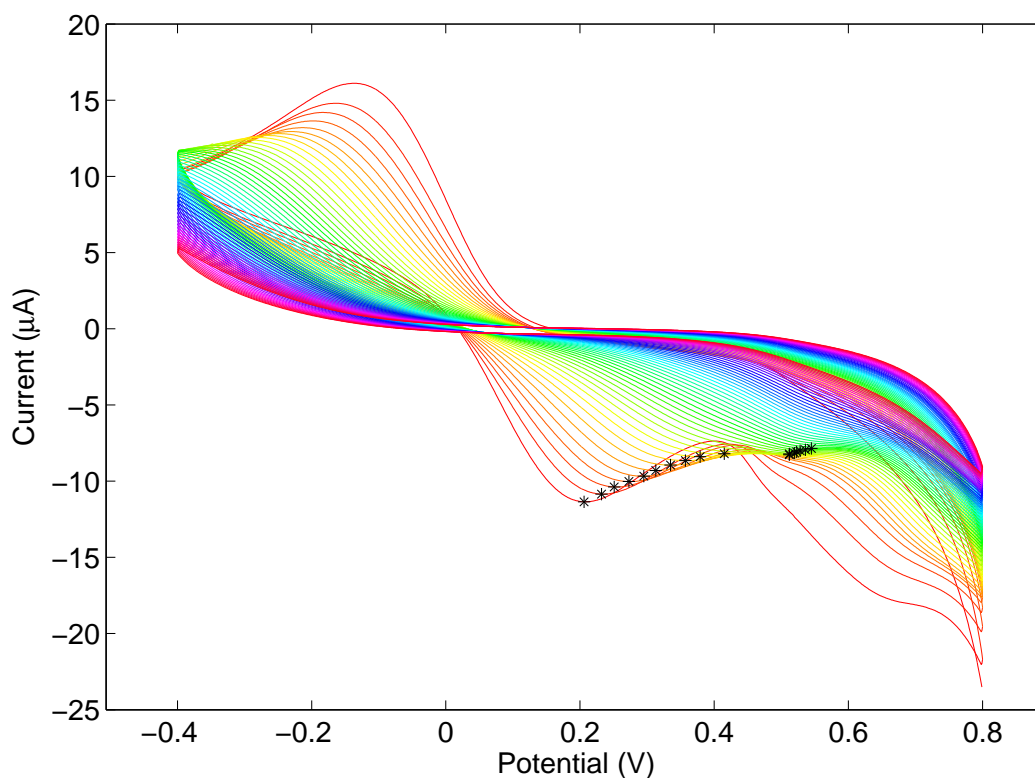


Figura C.1: Esempio di esecuzione dell'algoritmo *movingmin*. In nero i minimi locali rilevati. Traccia: ciclo voltammogramma di ferricianuro 1 mM in DMEM, 75 cicli,  $\nu = 100$  mV/s, quiet time = 2 s.





# Tavola degli acronimi

Acronimo	Significato inglese	Traduzione italiana
AC	Alternating Current	Corrente alternata
CE	Counter Electrode	Controelettrodo o elettrodo ausiliario
CPE	Constant Phase Element	Elemento a fase costante
CV	Cyclic Voltammetry	Ciclovoltammetria o voltammetria ciclica
DGR		Delibera della Giunta Regionale
DC	Direct Current	Corrente continua
DL	Double Layer	Doppio strato
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium	Mezzo di Eagle con modifiche di Dulbecco
DSC	DropSens Carbon	(sensore) DropSens Carbon
EIS	Electrochemical Impedance Spectroscopy	Spettroscopia d'impedenza elettrochimica
ESI	Electrode-Solution Interface	Interfaccia elettrodo-soluzione
GFW	Generalized Finite Warburg	(elemento) Wargurg finito generalizzato
HBRS	HEPES-buffered Ringer solution	Soluzione di Ringer tamponata con HEPES
HEPES	4-(2-HydroxyEthyl)-1- -PiperazineEthaneSulfonic acid	Acido 4-2-idrossietil-1-piperazinil- -etansolfonico
IHP	Inner Helmholtz Plane	Piano interno di Helmholtz
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry	Unione internazionale della chimica pura e applicata
LDH	Lactate DeHydrogenase	(enzima) Lattato deidrogenasi
NADH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Hydrogenated	Nicotinammide adenina dinucleotide idrogenato (forma ridotta)
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamide Adenine Dinucleotide	Nicotinammide adenina dinucleotide (forma ossidata)
NLLS	Non-Linear Least Squares	Minimi quadrati non lineari
OHP	Outer Helmholtz Plane	Piano esterno di Helmholtz
PBS	Phosphate Buffered Saline	Tampone fosfato salino
RE	Reference Electrode	Elettrodo di riferimento
SEM	Scanning Electron Microscope	Microscopio elettronico a scansione
SHE	Standard Hydrogen Electrode	Elettrodo standard a idrogeno
SR	Scan Rate	Tasso di scansione
WE	Working Electrode	Elettrodo di lavoro



# Bibliografia

- [1] A. C. Fisher, *Electrode Dynamics*. Oxford University Press, New York, 1996
- [2] J. Wang, *Analytical Electrochemistry*. Wiley VCH, New York, 2nd edition 2001
- [3] I. Rubinstein, *Physical Electrochemistry: Principles, Methods and Applications*. Marcel Dekker Inc, 1995
- [4] J. W. Jost, T. Renner, *Nomenclature of Inorganic Chemistry: IUPAC Recommendations 2005 (Red Book)*. RSC Publishing, 2005
- [5] R. Bertani, D. A. Clemente, G. Depaoli, P. Di Bernardo, M. Gleria, B. Longato, U. Mazzi, G. A. Rizzi, G. Sotgiu, M. Vidali, *Chimica generale e inorganica*. Casa Editrice Ambrosiana, 2a edizione 2006
- [6] J. Lyklema, *Lyotropic sequences in colloid stability revisited*. *Advances in Colloid and Interface Science* 100 –102 (2003) 1–12
- [7] S. Srinivasan, *Fuel Cells: From Fundamentals to Applications*. Springer, 2006
- [8] P. Gründler, *Chemical Sensors. An Introduction for Scientists and Engineers*. Springer, 2007
- [9] F. G. Banica, *Chemical Sensors and Biosensors. Fundamentals and Applications*. John Wiley & Sons Inc, 2012
- [10] X. Li, L. Zhao, Z. Chen, Y. Lin, P. Yu, L. Mao, *Continuous Electrochemical Monitoring of Extracellular Lactate Production from Neonatal Rat Cardiomyocytes following Myocardial Hypoxia*. *Analytical Chemistry* 2012, 84, 5285-5291
- [11] K. S. Prasad, J. C. Chen, C. Ay, J. M. Zen, *Mediatorless catalytic oxidation of NADH at a disposable electrochemical sensor*. *Sensors and Actuators B*, 123 (2007) 715-719
- [12] A. Radoi, D. Compagnone, *Recent advances in NADH electrochemical sensing design*. *Bioelectrochemistry*, 76 (2009) 126-134
- [13] A. J. Bard, L. R. Faulkner, *Electrochemical Methods. Fundamentals and Applications*. John Wiley & Sons, New York, 2nd edition 2001
- [14] E. Barsoukov, J. R. Macdonald, *Impedance Spectroscopy. Theory, Experiment and Applications*, Wiley-Interscience, Hoboken, 2nd edition 2005
- [15] D. Vladikova, *The Technique of the Differential Impedance Analysis. Part I: Basics of the Impedance Spectroscopy*. *Proceedings of the International Workshop “Advanced Techniques for Energy Sources Investigation and Testing”*, 4 – 9 Sept. 2004, Sofia, Bulgaria

- [16] W. Lai, *Impedance Spectroscopy as a Tool for the Electrochemical Study of Mixed Conducting Ceria*. Ph.D. Thesis, California Institute of Technology, 2007
- [17] B. Gorrec, C. Le Montella, *Handbook of Electrochemical Impedance Spectroscopy*, 2012
- [18] A. Lasia, *Electrochemical Impedance Spectroscopy and its Applications*. Kluwer Academic/Plenum Publishers 1999, Vol. 32, p. 143-248,
- [19] C. Gabrielli, *Identification of electrochemical processes by frequency response analysis*. Technical report number 004/83. 1998
- [20] J. Bisquert, *Theory of the Impedance of Electron Diffusion and Recombination in a Thin Layer*. The Journal of Physical Chemistry B, Vol. 106, Issue 2, p. 325-333, 2002
- [21] J. R. Macdonald, *Impedance Spectroscopy and its use in analyzing the steady-state AC response of solid and liquid electrolytes*. Journal of Electroanalytical Chemistry, 223 (1987) 25-50
- [22] J. R. Macdonald, *Note on the parameterization of the constant-phase admittance element*. Solid State Ionics, 13 (1984) 147-149

# Sitografia

1. <http://www.pd.infn.it/~rnobili/biofisica08/>
2. <http://www.centropiaggio.unipi.it/sites/default/files/course/material/Cap3.pdf>
3. <http://www.centropiaggio.unipi.it/sites/default/files/course/material/4A.pdf>
4. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/p3289>
5. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/244023>
6. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/n8129>
7. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/p3813>
8. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/n7004>
9. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/s8636>
10. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/g1272>
11. [http://www.euroclonogroup.it/allegati/prodotti/documenti/ECM0103L\\_3124\\_.pdf](http://www.euroclonogroup.it/allegati/prodotti/documenti/ECM0103L_3124_.pdf)
12. [http://www.dropsens.com/pdfs\\_productos/new\\_brochures/110-c110.pdf](http://www.dropsens.com/pdfs_productos/new_brochures/110-c110.pdf)
13. <http://ocw.mit.edu/courses/chemical-engineering/10-626-electrochemical-energy-systems-spring-2011/lecture-notes/>